生命科学名著

糖生物学概述（原书第三版）

Introduction to Glycobiology

THIRD EDITION

〔英〕M. E. 泰勒　K. 德里卡默　编著

马毓甲　译



科学出版社

(Q-3094.0101)

封面设计 / 美光设计

学界对本书的评价

“衷心地推荐……这是一本糖生物学教师和学生绝对必备的好书。”

Microbiology Today

“这本书很好地涵盖了糖生物学的各个方面并且为进行持续研究提供了具有相当深度的平台。”

Lancaster 大学Gavin M. Brown博士

“Taylor 和 Drickamer编写的这本书比其他同类书更加清晰和简明扼要。”

John Hopkins大学Y. C. Lee教授

“在其他现有已出版的同类教科书中，我特别欣赏这本《糖生物学概述》。”

Utrecht 大学J. P. Kamerling博士、教授

糖作为生命能源，人们已耳熟能详，但糖的生物重要性已远远超出其作为细胞燃料能源的价值。

《糖生物学概述》的特点

本书展示了糖类或聚糖对生物系统产生的真实而重要的影响，阐释了其在分子、细胞和生物体水平上的作用。该书的结构分作两大部分，在探索生物系统，如在发育、细胞信号传送、蛋白质运输中糖的多样作用之前，通过基本原理和基础概念的学习打下坚实的基础。本书还强调糖生物学对疾病的重要性，通过糖生物学与疾病之间联系的知识可以开发对疾病新的治疗对策。

第三版新增内容

- 更新了反映糖生物学领域最新进展的内容：增加了关于糖基化细胞生物学的新章节，扩充了先天性疾病、流感病毒、蛋白聚糖、肌营养不良和癌症的内容。
- 在书中关于糖化学的第一部分与关于生物和生物医学的第二部分之间增设了边注交互参考信息，凸显结构与功能之间的关联性。
- 增设最新专题框式平台，介绍目前糖生物学研究和糖生物学在疾病和治疗方面的现状。
- 扩展了分析方法的处理，包括为糖阵列这一前沿技术提供了概要性的介绍，提高了读者对这一尖端技术的了解。

本书作者

Maureen Taylor：伦敦帝国学院分子生物学部高级讲师及牛津德文郡埃克塞特学院生物化学系成员和辅导教师。

Kurt Drickamer：伦敦帝国学院分子生物学部生物化学教授。



www.sciencep.com

科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网 址：http：// www.lifescience.com.cn



销售分类建议：生物学／生物化学

定价：88.00元

生命科学名著

糖生物学概述（原书第三版）

Introduction to Glycobiology (Third Edition)

〔英〕M.E.泰勒　K.德里卡默　编著

马毓甲　译



科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2011-6073 号

内 容 简 介

这是一本为大学本科生和硕士研究生设计的糖生物学课程的教科书。全书分成两大部分，第一部分讲授聚糖（糖链）结构和生物合成，为后面的学习打下基础；第二部分内容是生物学中的聚糖，包括聚糖糖基化对蛋白质结构和功能的影响、糖基化与发育学、糖基化与疾病等热点课题，以及哺乳动物系统糖基化作用以外的一部分植物、细菌和病毒糖生物学等内容。

除作为教科书外，本书也适用于作为分子生物学、分子细胞生物学，以及发育学、免疫学等科技研究人员的参考书。

图书在版编目（CIP）数据

糖生物学概述(原书第3版)/(英)泰勒(Taylor, M. E.)等编著；马毓甲译.
—北京：科学出版社，2013.5
(生命科学名著)
书名原文：Introduction to Glycobiology (Third Edition)
ISBN 978-7-03-036989-5

Ⅰ.①糖…　Ⅱ.①泰…　②马…　Ⅲ.①碳水化合物－生物化学　Ⅳ.①Q53

中国版本图书馆CIP数据核字（2013）第044876号

责任编辑：岳漫宇　李　悦 / 责任校对：桂伟利
责任印制：钱玉芬/ 封面设计：北京美光制版有限公司

科 学 出 版 社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
新科印刷厂 印刷
科学出版社发行　各地新华书店经销
*
2013年5月第　一　版　开本：787 × 1092　1/16
2013年5月第一次印刷　印张：18　3/4
字数：412 000
定价：88.00元
（如有印装质量问题，我社负责调换）

译者致谢

为了便于技术术语和词汇的统一，本书中所有的技术术语、词汇都采用了科学出版社英汉生物学大词典的翻译词汇和同一出版社出版的英汉生物学词汇（第二版）。在此对词典和词汇的主编和编辑一并致谢。

对科学出版社编辑李悦和岳漫宇对本书出版所付出的辛勤劳动深表谢意。

感谢家人和亲朋对译者工作的支持和帮助。

译者序

《糖生物学概述》这本书是两位著者为伦敦帝国学院（Imperial College London）和牛津大学 (University of Oxford) 生物化学系高年级本科生和低年级研究生编写的糖生物学课程教材。两位著者既是牛津大学生物化学系的教授，也是糖生物学研究所的研究人员。20 世纪 80 年代为糖生物学定名的 Raymond Dwek 教授就曾担任牛津大学生物化学系主任和糖生物学研究所所长。由此也可以看出糖生物学与生物化学之间的因袭关系。

由于本书是本科生和研究生学习糖生物学的教材，在每一章的标题下面都列出该章的学习目的。并在每一章和每一框式专题中都提出了有关专题的问题和列出了关于专题领域最近发表的主要文献。据编著者称这本书同时也希望为糖生物学领域以外的研究人员，包括生物化学家、细胞生物学家和免疫学家提供一本与其研究工作有关的，关于糖蛋白和糖脂等糖生物学概论的书。糖生物学领域以外的科研人士也需要一本简明易读的关于糖生物学功能的书。

自从 2006 年第一版出版发行以来，这本书连续出版发行了三版，深受业界的推崇和赞誉。2007 年《结构生物学当代见解》（*Current Opinion in Structural Biology*）期刊中，在浩瀚的糖生物学出版物中选择推荐了两本有关糖生物学的著作，其中一本正是由 Maureen E. Taylor 和 Kurt Drickamer 编著的这本《糖生物学概述》（*Introduction to Glycobiology*）。

很久以来，糖生物学与基因组学和蛋白质组学的关系密切，被认为是基因组学和蛋白质组学的延续，以及是分子细胞生物学最后的未经发掘的前沿学科。糖类已经成为备受关注的生命必需分子。译者矢志翻译这本书的原因不仅是因为这本书师出名门，也因为近几年人们在对糖基转移酶了解的基础上利用其功能研制了大量的临床药物，特别是对老年人慢性病的治疗药物。本书的第三版特别开辟了糖类治疗药物的框式平台，专门介绍新药制备现状。正因为糖基转移酶和糖蛋白的研究正成为生命科学研究中又一新的前沿和热点，将给人类带来健康的喜讯并对人

们的生存和生活质量带来更大的益处。译者同时也希望这本糖生物学小书能为从事糖生物学研究的人员在21世纪这一生命科学世纪的进程中提供一些激发创新立业的正能量和科研的切入点，促进国内糖生物学的发展。由于糖生物学涉及学科面广，并由于译者浅学恐难达到上述目的，恳切希望专家学者不吝赐教，批评指正，使这本书尽可能达到完美和起到其应有的作用。是为序。

译 者

壬辰年岁末于北京新科祥园

致　谢

这是我们的荣幸，再次感谢在糖化学和糖生物学各方面指导过我们的同事。感谢对此书前两版提出修改意见和建议的各位教授，他们是约翰霍普金斯大学的 Ed Lee、法国国立奥尔良大学的 Michel Monsigny、多伦多大学的 Harry Schachter、以色列魏茨曼学院的 Nathan Sharon、苏格兰邓迪大学的 Paul Crocker、斯坦福大学的 Bill Weis，以及牛津大学的 Madeleine Gentle、Russell Wallis、Daniel Mitchell 和 Andrew Fadden。我们要特别向 David Wing 敬意，他花了很多时间审阅了此书第一版的几章，并提出了很好的修改意见。我们还要感谢 Paul Crocker 和阿尔伯塔大学的 David Bundle，牛津大学的 David Harvey、Alison Critchley、Tony Merry、Pauline Rudd 和 Mark Wormald，罗马尼亚科学院生物化学研究所的 Andrei Petrescu，以及伦敦帝国理工学院的 Simon North 和 Anne Dell 提供了制作书中插图所需的资料。最后，我们对 Dewi Jackson 和牛津大学出版社的同仁就第三版版式提出的建议和高效的编辑出版工作表示衷心的感谢。

前　言

本书的宗旨

本书是为伦敦帝国理工学院（Imperial College London）和牛津大学（University of Oxford）本科高年级学生和刚入学研究生编写的生物化学专业糖生物学课程的副产物，但我们更希望本书能为更多的高级研究人员，如生物化学、细胞生物学、免疫学和病毒学家，以及在研究工作中会遇到糖蛋白、糖脂及其受体的专业研究人员提供糖生物学领域的概述性介绍。很多糖生物学领域之外的学者都有了解糖类功能的需求，但是他们发现该领域变得越来越让人迷惑不解。当他们面对有关糖的大量结构细节和对有些问题，如“为什么这些糖要摆在首位？”缺乏明确答案时，可能兴趣大减或知难而退。本书一方面将帮助教学老师讲授最新糖生物学观点和见解，同时也为那些试图在浩瀚信息中掌握重点的职业科学家提供全面的概述。

本书假定读者具有本科水平的生物化学和细胞生物学知识。我们的立意并不是要对整个糖生物学领域进行详尽无遗的论述，而是旨在为聚糖功能和这些功能如何在分子水平发挥作用提供概述。贯彻全书的都是经过精选的实例，遗憾的是因为考虑使本书做到言简意赅，并在糖生物学领域具有代表性，我们不得不舍弃一些有意义而且重要的事例。特别要指出的是本书重点关注于哺乳动物系统的糖基化作用，这种刻意的做法虽然在一定程度上缩小了这一学科的范围，但也让我们将人类疾病中的糖基化作用作为本书通篇的主题。

本书的运用

不同的授课老师对如何系统地组织糖生物学的教学持有不同观点。本书如此安排就是为了可以按任意顺序讲授，并能涵盖重要内容。在本书各章的材料内容中的每一节都有说明性的标题，解释各节的主要观点。关键的术语在第一次出现时即被重点标出，而且这些技术词汇大部分已在术

语汇编中界定。本书分为两大部分，第一部分描述不同类型聚糖的化学性质、结构及其生物合成。第二部分讲述糖基化的生物学功能。在这一新版书中增加了前后参照用的边注，相互联系各章，特别是各节之间有关联的主题。

第一部分里，第 1 章讲述了糖的化学和寡糖生物合成的背景知识，这些内容对了解之后的各项主题非常重要。第2章以N- 连接糖基化为背景，介绍了许多关于糖基化的基本原理。关于不同类型的 O- 连接糖基化的作用在第 3 章中讲述，同时着重强调了源自其独特物理性能的各种功能。第 4 章延续了第 3 章的讨论主题，增加了对膜中糖脂和糖蛋白的关注。第 5 章是此新版本新增的部分，阐释了糖基化的分子和细胞机制，并且重点突出了有关敲除小鼠实验的研究成果。第 6 章中关于聚糖分析策略和第 7 章中关于聚糖构象的内容并不要求学生在后续的章节之前学习，这些内容对有些学生来说或许有困难，学生可以直接从第 5 章跳到第二部分学习聚糖的生物学功能。

第二部分中的各章可以单独学习。第 8 章讨论了糖基化是如何影响蛋白质性状的。第 9 章和第 10 章主要讲述了聚糖的信息功能和解码信息的凝集素。第 9 章侧重于介绍凝集素在细胞黏附、信号传送和先天性免疫中的作用，而第 10 章则侧重于介绍介导细胞内外运输的凝集素。考虑到本书的主要目的是简明扼要地介绍糖生物学，因此重点放在了哺乳动物系统，但在第 11 章中简略地介绍了哺乳动物以外的糖生物学。第 12 章讲述了发育糖生物学，尽管介绍的大多数结果和影响实例缺乏令人满意的分子结构层面的解释，但这一专业领域已成为糖生物学研究范畴中最活跃的部分。糖基化在疾病演化过程中的作用是贯穿全书始终的主题。边注用来突出表明讨论主题的位置。在此版本中添加了框式版面，主要用于介绍关于疾病和治疗方面的特殊课题。第 13 章中主要考虑某些实例的细节问题。第 14 章对糖生物学发展的主导方向提出了一些意见。

本书提出的一些教学的辅助措施是为了使糖生物学学习更加轻松，所以在每一章的开头就明确了“学习目的”。提出的学习目的和提供的名词汇编都可以用来帮助本科学生自行检查自己的学习成果。在每一章、每一框式特殊主题后面都附有一组习题和论述题。列出的主要参考文献以简明扼要为主，包括了当前研究成果的综述，通过这些文献可以了解最新研究领域的趋势和成果。许多问题和图例也列出了一些论文参考文献，可以让学生更深入地探究原始文献。

网上信息中心

通过牛津大学出版社**网上信息中心**的网址 **http://www.oxfordtextbooks. co.uk/orc/taylor3e/** 可以直接与书中的主要参考文献链接，并且定期地更新和增加一些有重要意义的课题。读者可以通过本书提供的蛋白质数据库的编码，查看 **3D 旋转结构**。专门为授课教师提供的**全彩色**图片可以从该网站下载。本书的注册用户还可以找到书中习题的参考答案。还可以通过访问 www.oxfordtextbooks.co.uk/orc/taylor3e/ 进入网上信息中心。

此版新的内容

- 反映目前糖生物学科发展现状的更新内容包括：添加了关于糖基化细胞生物学的全新一章。并且扩充了天然疾病、蛋白质聚糖、流感病毒、肌肉萎缩症以及癌症的内容。
- 增加了第一部分（化学部分）与第二部分（生物和生物医学部分）之间相互参照的边注文献，强调了结构与功能的相关性。
- 新增和更新了特殊主题的框式版面，集中地反映目前糖生物学在疾病和治疗中的研究和应用。
- 拓宽了治疗的分析方法，包括聚糖阵列分析。

目　录

糖生物学概念

1

学习目的

学习本章后应知内容：

1. 糖缀合物的类别及其在真核细胞中的定位
2. 糖蛋白和糖脂中单体糖结构
3. 糖苷键的性能及其形成
4. 糖基化的功能类型

界定与蛋白质和生物膜结合糖类的生物学功能，并确定这些功能是如何行使的，是糖生物学的艰巨任务和追求的目标。任务在继续进行，表述蛋白质和脂质结合的糖如何介导生物过程的原理变得越来越清晰。本章的主要目标是通过糖蛋白和糖脂熟知的功能实例，重点阐释糖脂这类分子糖部分的重要作用。

1.1 糖生物学的研究领域包括与蛋白质和脂质结合糖类的多种功能

生物化学家大多在最初研究细胞能量代谢的背景下与糖接触。从生物化学导论教科书中，已经出现过葡萄糖和糖原分解获取能量的代谢途径。糖原甚至可以与一个蛋白质核心连接，因此被认为是一种糖蛋白。然而，通常并不把糖分子的能量储运功能归于糖生物学范畴。尽管这样规定有些专断，但有其好的一面，这样做，人们就可以专注于研究糖在其他方面至今还不十分了解的功能。

单糖、寡糖或多糖与蛋白质或脂质结合形成糖缀合物（glycoconjugate）。形成的糖蛋白（glycoprotein）和糖脂（glycolipid）中的糖部分，一般都是复合的杂聚物，与糖原和直链淀粉等储积的多糖为重复的同聚物不同。通常把糖蛋白和糖脂中的糖部分称作聚糖（glycan）。聚糖可以由储积能量的基本构件——葡萄糖构成，也可以由其他的单糖单位组成。

结合蛋白质和脂质的聚糖，其功能与蛋白质本身的功能颇为相似，不是单纯地只有一种功能，而是在许多方面，如在作为酶、激素、转运体以及结构元件方面都有重要作用。本章总结出聚糖至少有五大类功能，分别在随后的各章中详细讨论（图 1.1）。糖缀合物的结构性作用表明了聚糖本身的物理性质，因此，与结构性聚糖相连的蛋白质和脂质被看作是具有组织作用的支架。聚糖能够在运输、黏附和信号传递方面发挥作用，还需要与被称为凝集素（lectin）的受体蛋白相互作用。所以，糖生物学还应包括糖缀合物的研究、生物合成催化酶以及识别糖的凝集素的研究。

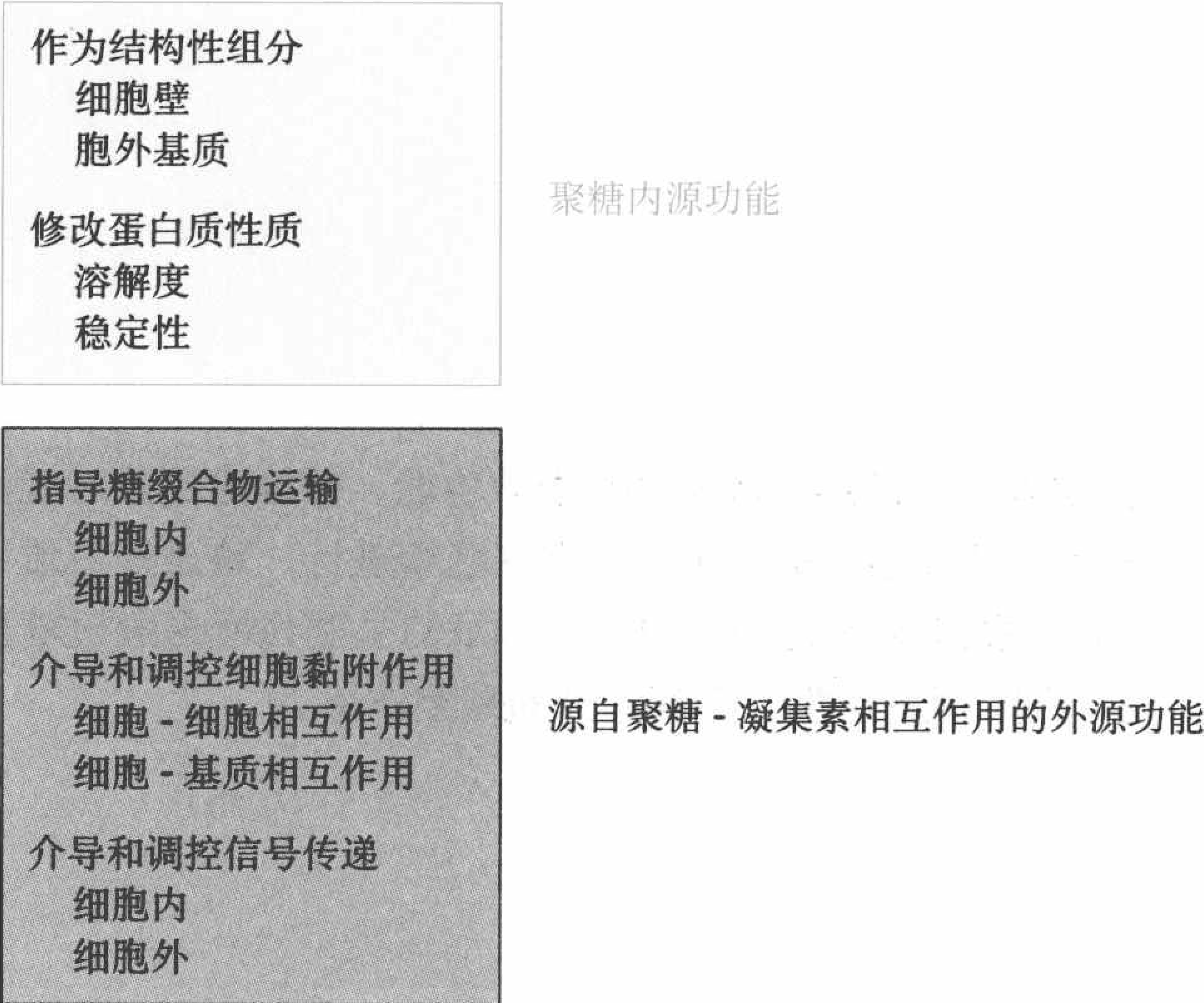


图 1.1　聚糖功能一览

1.2　三类主要的糖缀合物

本书关注三类聚糖：与脂质连接的聚糖、通过氮原子与蛋白质连接的 N- 连接寡糖 / 聚糖（N-linked oligosaccharide/glycan)、通过氧原子连接蛋白质的 O- 连接寡糖 / 聚糖 (O-linked oligosaccharide/glycan)。糖蛋白和糖脂都出现在质膜的细胞外表面。另外，糖蛋白还可以分泌到血清等生物体液中，也可以构成或补充环绕细胞的不溶性胞外基质（图 1.2）。已经对所有这些分子组进行了研究，但对与可溶性分泌蛋白结合的 N- 连接聚糖了解得最清楚。将载有 N- 连接寡糖的糖蛋白作为重点讨论，是因为血清糖

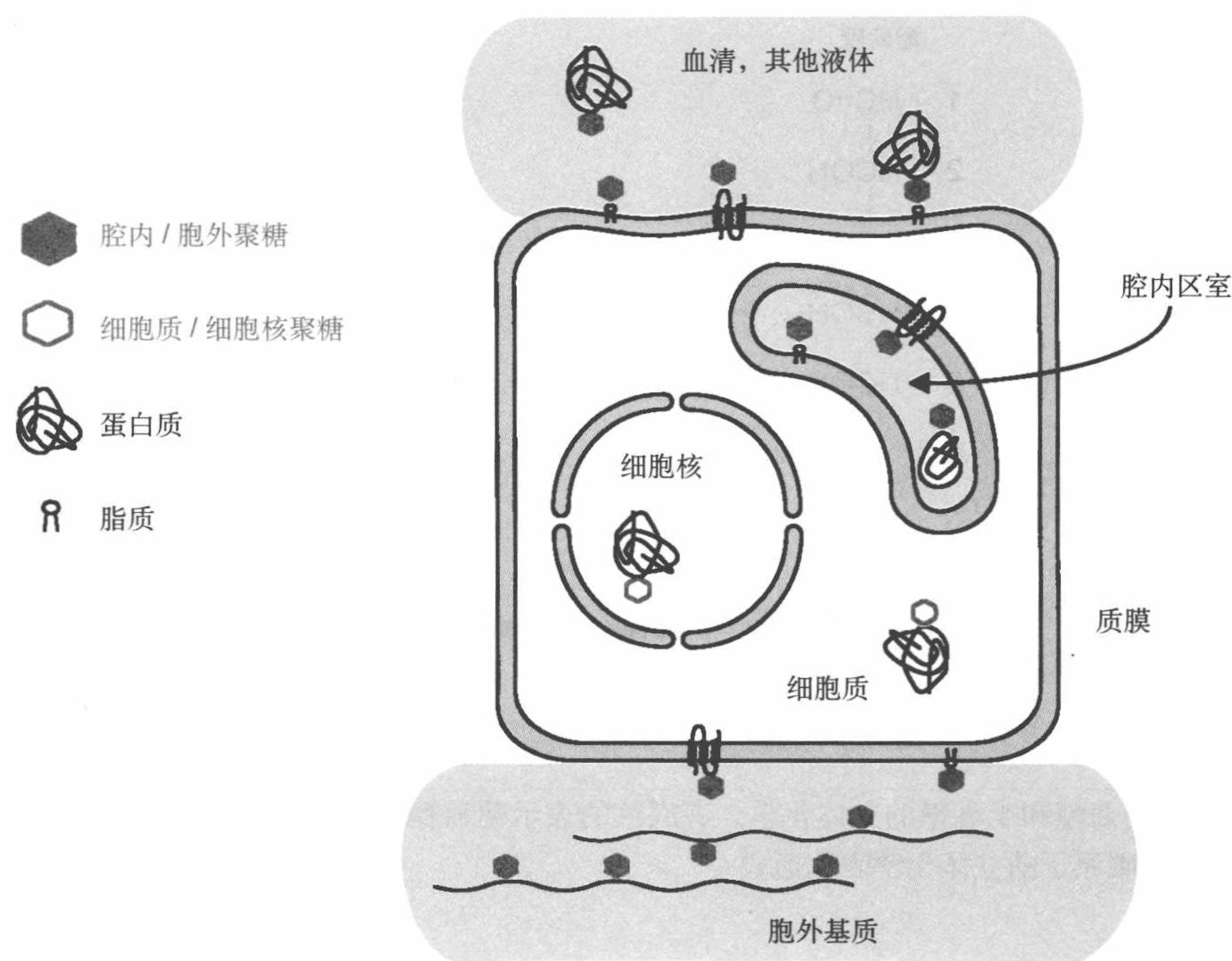


图 1.2 糖缀合物在胞内外区室的定位

蛋白在历史上是较易获得的研究对象。因此，将这一组糖蛋白作为全书的重要参考。当这组糖蛋白到达细胞表面之前，糖缀合物必须在细胞内部构成，这一过程发生在内质网和高尔基体腔内。事实上，糖基化的各个步骤形成了细胞分泌机构的整体部分。由此，多数糖缀合物通过一种膜与胞质分开。但是，糖缀合物并不是绝对地分离到胞外基质区室，因为也有胞质和细胞核形式的糖基化。

1.3 聚糖由相关化学结构的单糖组成

己糖 (hexose) 是最常见的聚糖组分。己糖中 6 个碳原子中的 4 个为手性中心，因为 2、3、4、5 各碳原子与 4 个不同化学结构连接（图 1.3）。各碳原子周围的取代基都可以按两种不同的立体化学方式布置。每个手性中心可以有两种构型，因此，总数共有 16 个可能的己糖。常以 D 或 L 前缀分别命名 16 个己糖中的 8 个己糖系列。例如，D- 葡萄糖（D-glucose）

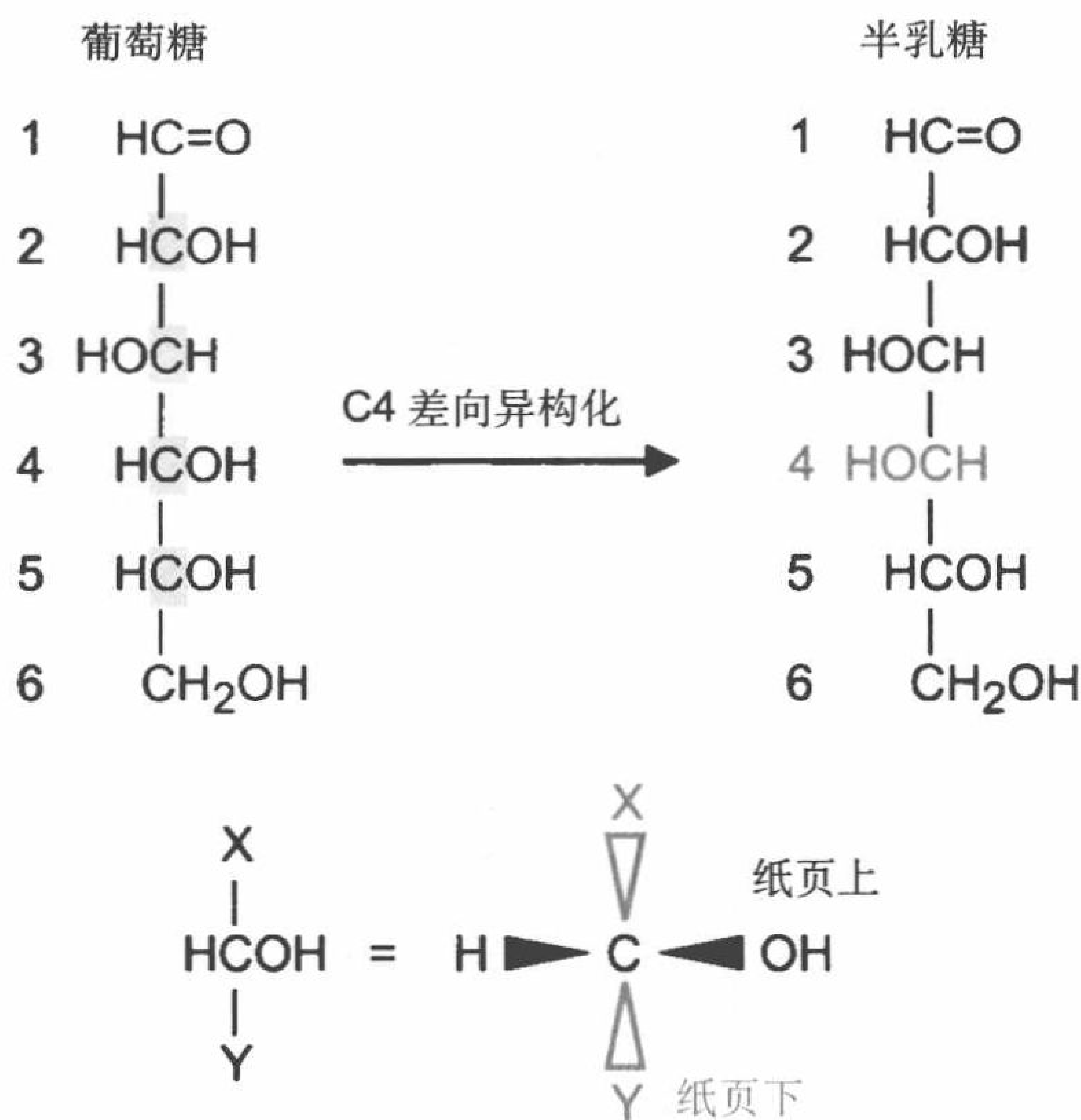


图 1.3 葡萄糖和半乳糖的立体化学。有底纹的表示葡萄糖中 4 个不对称碳原子，下图是不对称碳原子的立体化学表达通式

与 D- 半乳糖（D-galactose）只有碳 4 原子构型不同。糖分子中，如果只有一个碳原子立体化学构型有变化，被称为差向异构化 (epimerization)，因而，D- 葡萄糖和 D- 半乳糖被称为差向异构体 (epimer)。相比之下，因为 D- 葡萄糖和 L- 葡萄糖这两种己糖中每个不对称碳原子构型方向均相反，互为镜像，这种成对的镜像构型被称为对映体 (enantiomer)。

正常情况下，糖缀合物中的己糖常以六元环吡喃糖构型 (pyranose configuration) 的形式出现 (图 1.4)。由 5- 羟基与 1- 醛基反应形成环，并产生半缩醛。在 D- 吡喃型葡萄糖（D-glucopyranose）和缩略词 D-Glcp 己糖的名称中可以清晰地表示吡喃糖的构型。但是，通常并不显示上述呋喃的标识。环状形式中的 C1 原子与 4 个不同的化学原子连接成为手性中心，并存在两种立体化学构型。C1 被称为异头物碳 (anomeric carbon)，而且这两个异头物构型或异头物，以 α 和 β 加以区别。C6 位于环外，因而被称为环外的 (exocylic)C6。

只有少数几种己糖常出现于糖缀合物中（图 1.5）。葡萄糖（glucose, Glc）很适合作为对比己糖结构的参比化合物，因为葡萄糖只通过差向异构化或取代反应即可衍生出许多己糖结构。例如，葡萄糖 2 位的差向异构化产生甘露糖（mannose, Man），4 位碳的差向异构化产生半乳糖 (galactose, Gal) 等。用酰化氨基取代葡萄糖或半乳糖的 2- 羟基可生成 *N*- 乙酰葡糖胺

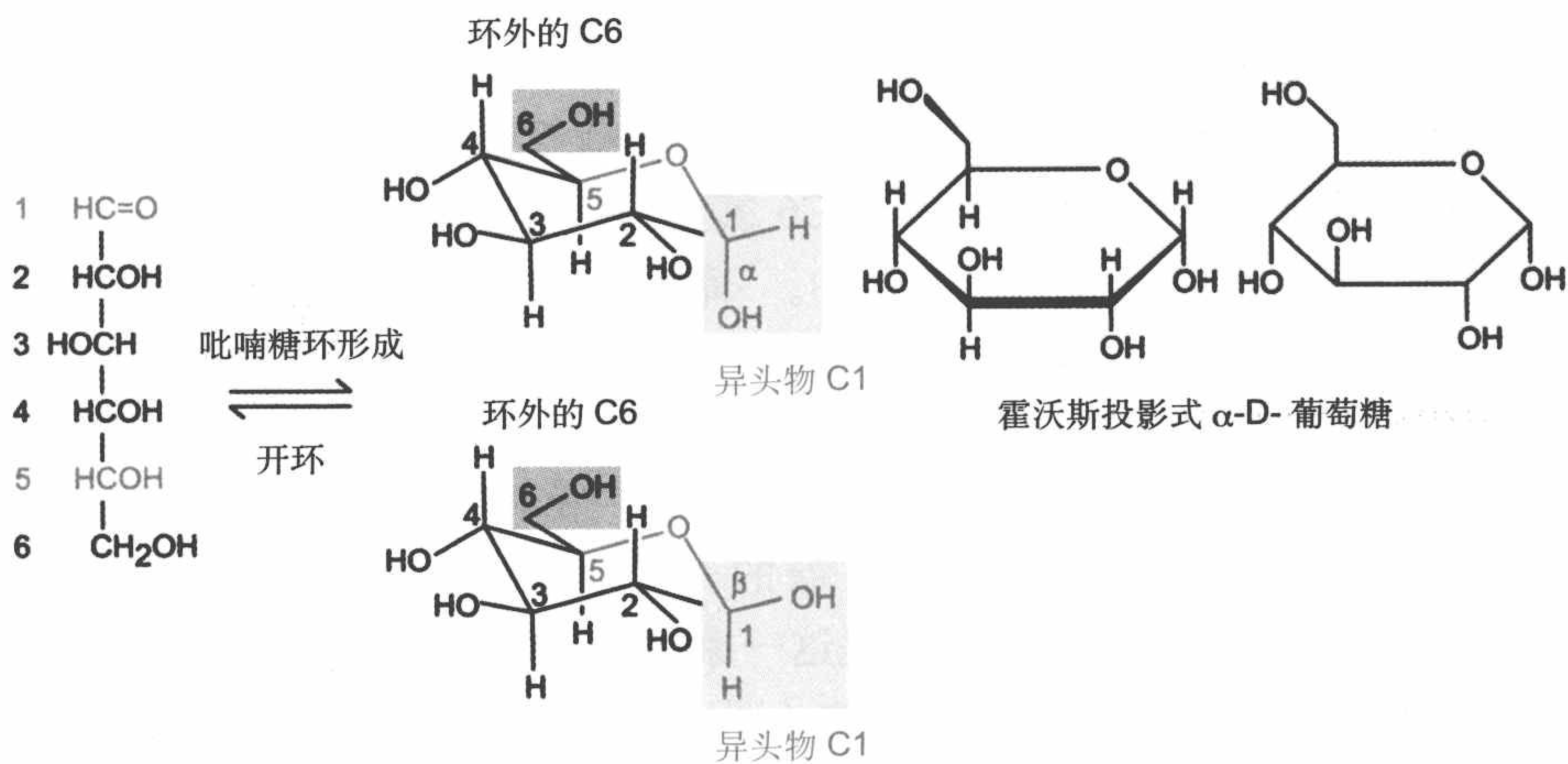


图 1.4 两种吡喃糖六元环方式的葡萄糖，其中 C1 可以是 α 或 β 构型，有时也采用霍沃斯（Haworth）环状结构的表示方式

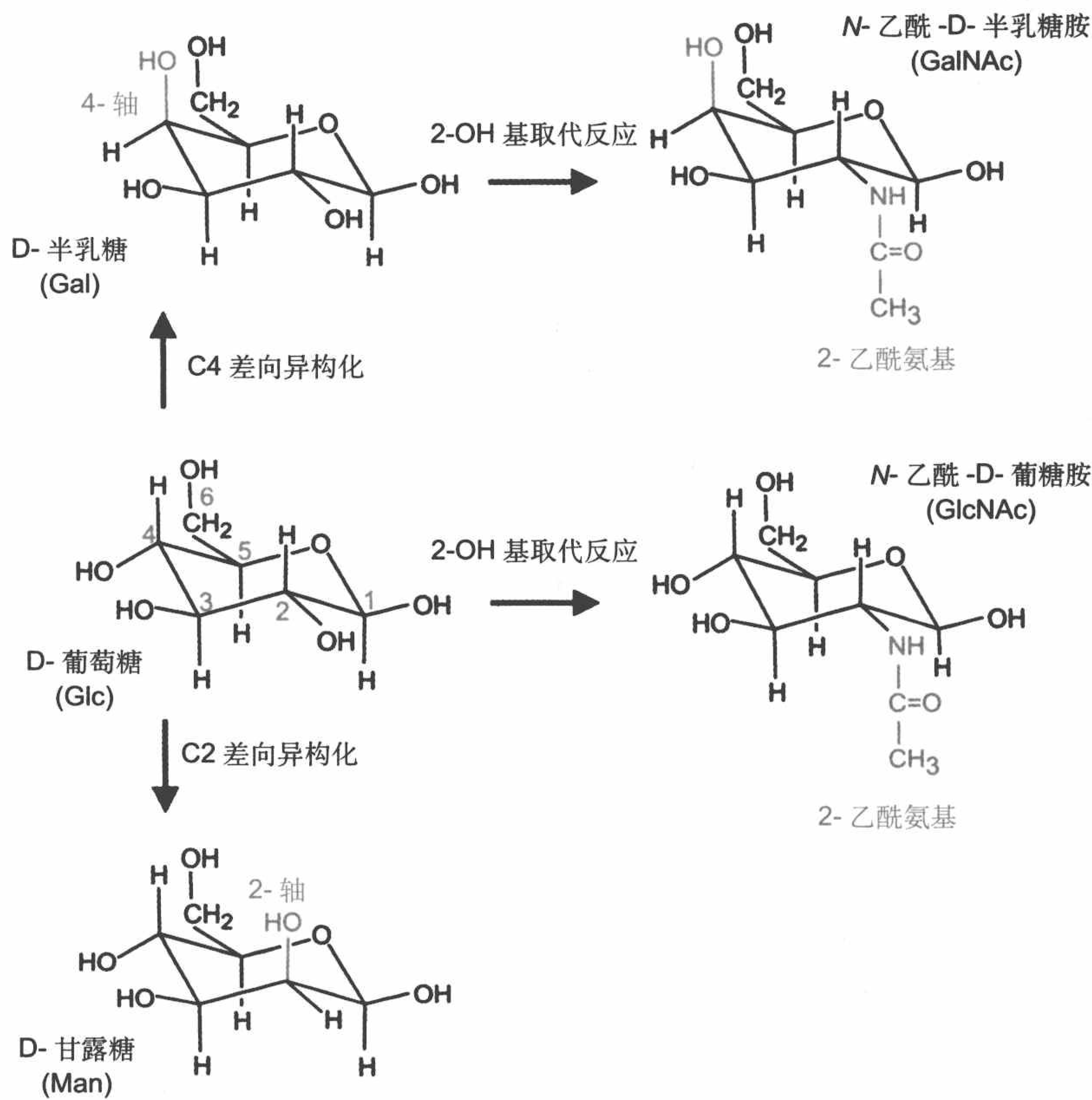


图 1.5 常见己糖和 *N*- 乙酰己糖胺之间的关系

(*N*-acetylglucoseamine, GlcNAc)，或 *N*- 乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)。所有这些聚糖常以 D 型构型出现，因此在描述聚糖结构时通常将 D 型结构的标识省略。

还有一些修饰形式的简单已糖常出现在糖缀合物中（图 1.6）。这些衍生物产生于 C6 的变化，例如：C6 氧化为羧基生成糖酸 (sugar acid)，如葡糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA)。 葡萄糖中除去 C6 可生成五碳糖 (pentose)——木糖 (xylose, Xyl) 。哺乳动物糖蛋白中发现的岩藻糖 (fucose, Fuc) 是一个很有意思的例子，失去 6 位羟基的岩藻糖，变成了半乳糖家族的成员，但不是 D 构型，而是 L 构型，成为 6- 脱氧 - D- 半乳糖镜像分子。

唾液酸（sialic acid）涵盖了糖的一个大家族，*N*- 乙酰神经氨酸 (*N*-acetylneuraminic acid, NeuAc) 是这一家族的一个成员，也是哺乳动物中经常出现的唾液酸形式的糖缀合物 (图 1.7)，它是由丙酮酸与 *N*- 乙酰甘露糖胺（*N*-acetylmannosamine）缩合而成的九碳糖酸。在六元环中，经常发现在 2 位的羰基和在半缩酮 6 位的羟基结合形成的构型。从六元环上可延伸形成几种独特的取代基，如 1 位的羧基、C5 上连接的乙酰氨基和由

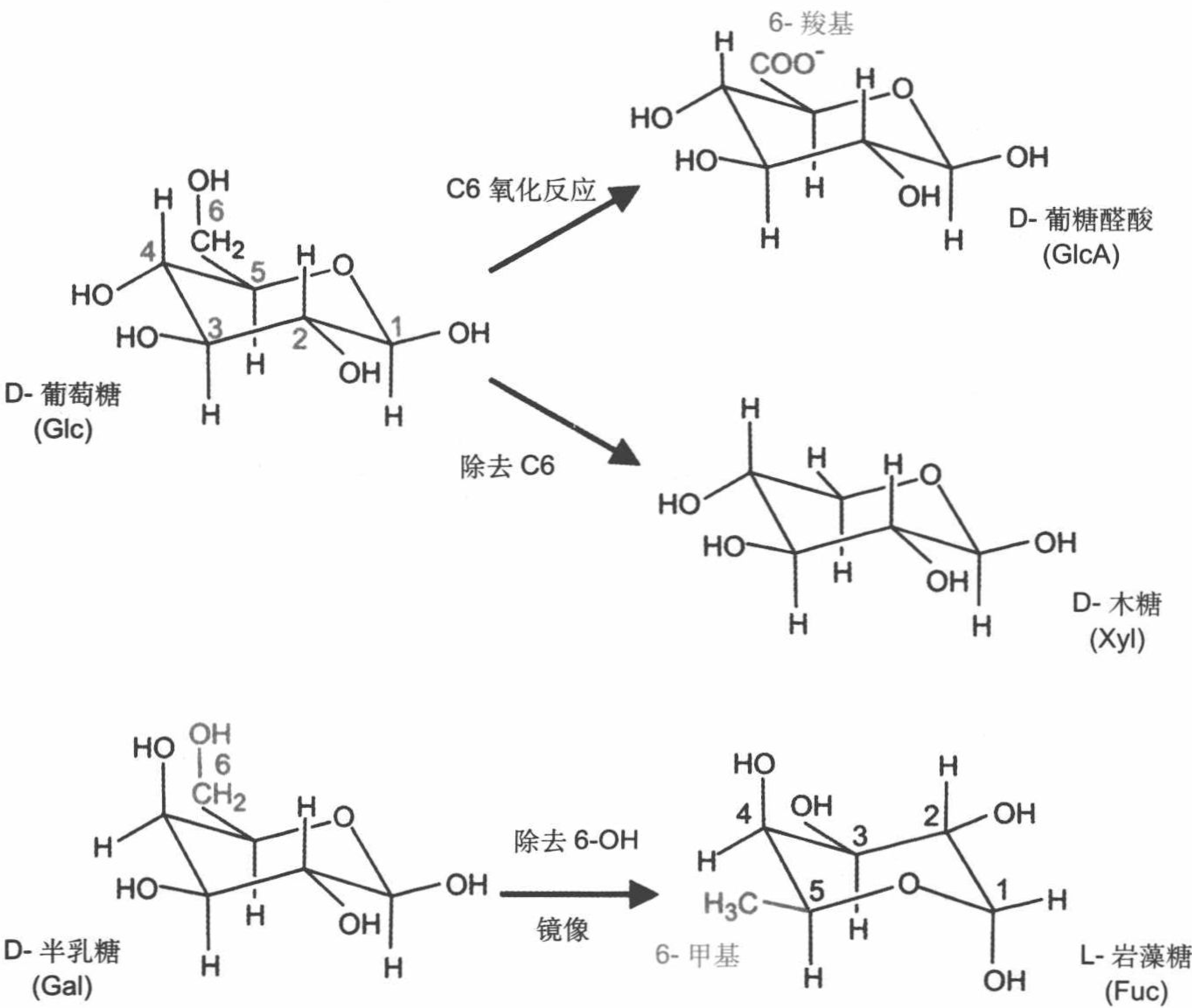


图 1.6　几种常见的已糖衍生物的结构

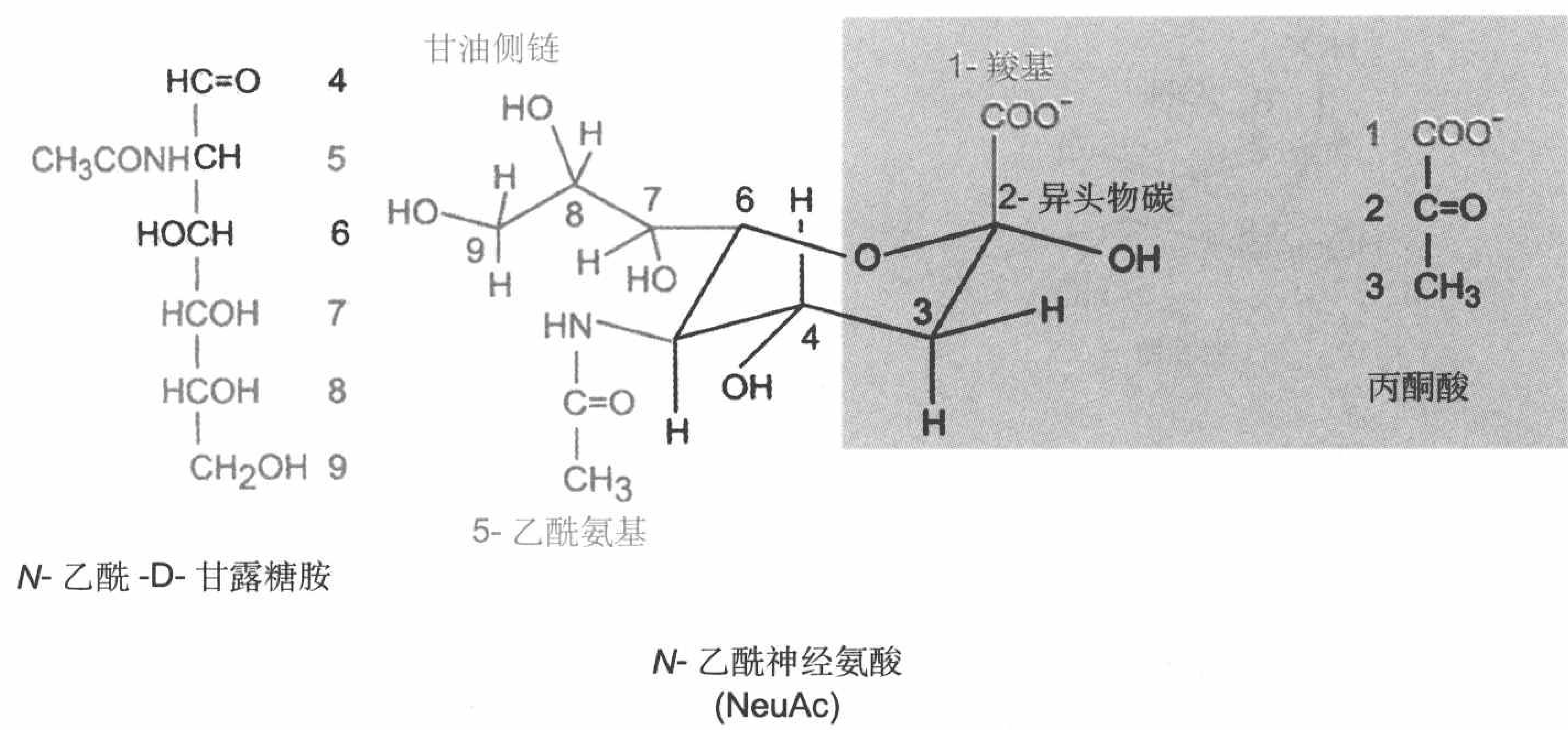


图 1.7 最常见形式的唾液酸（*N*- 乙酰神经氨酸）结构 。C1 ～ C3 衍生自丙酮酸，C4 ～ C9 衍生自 *N*- 乙酰甘露糖胺

C7、C8、C9 组成的三碳链。因为 C7、C8、C9 3 个碳都被羟基化，常把该三碳链称作甘油侧链。

1.4 单糖之间的糖苷键存在多个种构型

环状构象半缩醛的单糖与另一单糖的羟基进行缩合反应，在失去一个水分子的同时形成缩醛，产生的结构就是糖苷键（glycosidic linkage）(图 1.8)。如在游离糖中一样，这一异头物 C1 是与 4 个不同化学原子连接，并存在 α 或 β 构型。

只要给出单糖成分和连键的特征，就可以明确显示出其二糖结构。例如，Galβ1-4Glc 为乳糖二糖结构，表明在半乳糖 C1 和葡萄糖 4- 羟基之间形成糖苷键，并表明半乳糖的异头物碳 C1 为 β 构型。这一葡萄糖残基以半缩醛的形式保留着醛基的功能。由于醛基具有还原 Cu^{2+} 无机离子的能力，因而被称为二糖的还原端 (reducing end)，半乳糖残基则为非还原端 (non-reducing end)。

可能出现在糖蛋白中典型 N- 连接聚糖的完整化学结构庞大而复杂 (图 1.9），需要一种能够表达单糖和连键信息的描述方式。尽管由这一命名法提供了一些简化的表达方式，如偶尔用图片形式表示结构。通过对各种单糖指定图形，许多结构信息都可以用缩略图形表示。虽然有些信息，如连

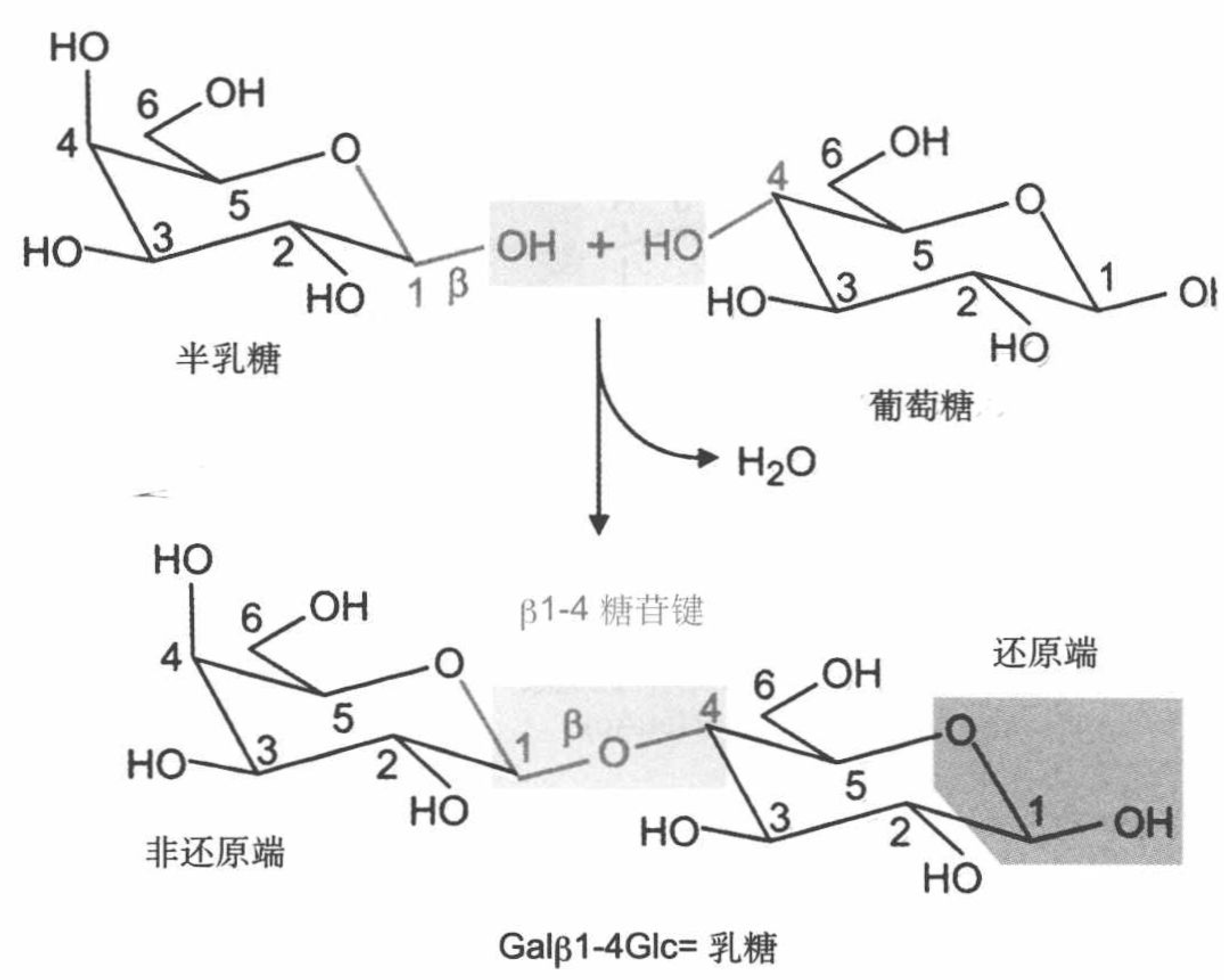


图 1.8 糖苷键的构成。单糖（以半乳糖为例）还原端的羟基与第二单糖的另一羟基（图中表示的为葡萄糖 4-OH）缩合失去水分子，形成糖苷键。构成连键后，只保留葡萄糖 1 位的还原基团，该基团被定义为二糖还原端

键性质的信息，在这种表达方式中失去，但这种符号约定方法对详细结构描述，特别是对重复修饰结构的描述，非常简便。

1.5 糖苷键的形成需要能量和特异酶催化

在半乳糖和葡萄糖单糖之间形成糖苷键，构成如乳糖（lactose）的二糖是能量上不利的反应过程（图 1.10）。另有许多生物化学过程通过偶联能量有利的磷酸酐键水解反应，获取形成连键所需的自由能。这一能量上有利的偶联过程分两阶段进行。首先利用腺苷三磷酸 (ATP) 中两个磷酸键水解的高能量，驱动核苷酸糖供体（nucleotide sugar donor）——尿苷二磷酸 (UDP)- 半乳糖的形成（图 1.11）。随后，再用 UDP- 半乳糖与葡萄糖构成糖苷键。

其他一些核苷酸糖供体也可以同样方式构成。糖基转移酶（glycosyltransferase）可以催化从供体转移糖，并负责糖苷键的形成。这

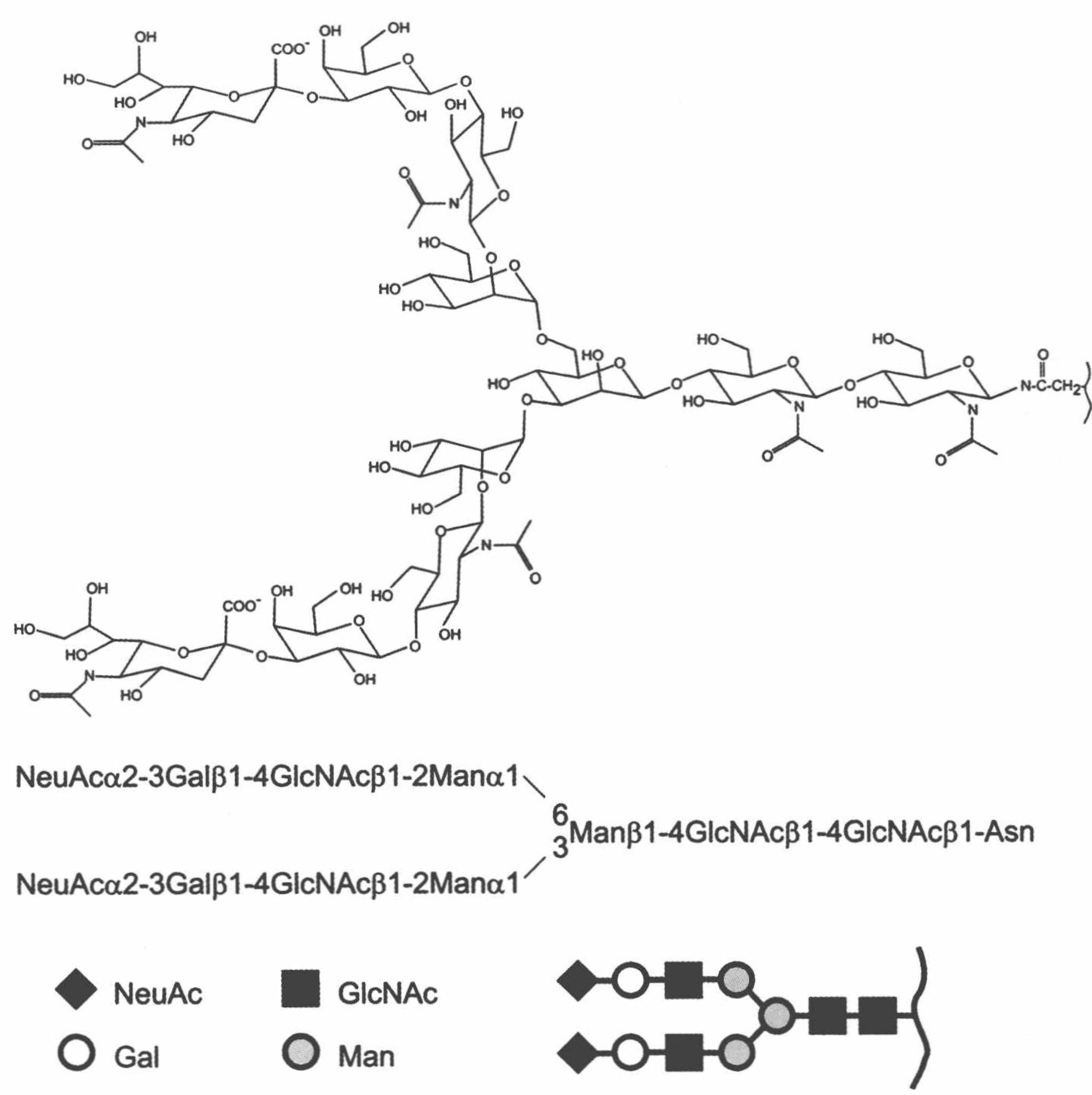
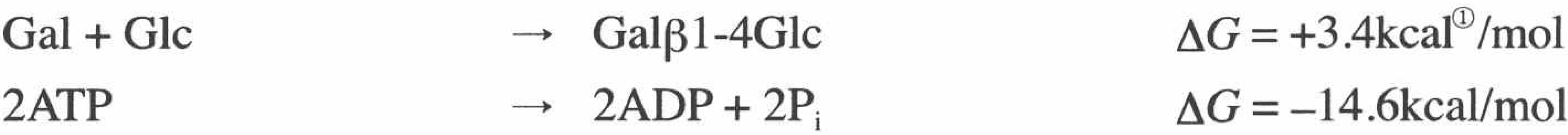


图 1.9 以完整的化学结构、缩略词和符号表示出现在糖蛋白中的典型 N- 连接聚糖。虽然以往的出版物使用了不同的符号、代码，现在研究人员一致同意使用此处采用的符号。在连键信息已经了解的情况下，这些符号特别适用

种糖基转移酶对一种核苷酸糖供体和一种接纳体具有专一性。在乳糖合成中，葡萄糖作为接纳体分子。糖基转移酶的全称可以明示核苷酸糖供体、接纳体和连键形成后的性质。乳糖的形成，应该由 UDP- 半乳糖——葡萄糖 β1-4- 半乳糖基转移酶催化。为简便起见，通常采用 β1-4- 半乳糖基转移酶这一简短名称。

由于每一种糖基转移酶对供体和接纳体都具有严格的专一性，因此，一种酶在一特定的连键中只能添加一种糖。例如，合成乳糖和合成 *N-* 乙酰乳糖胺 (Galβ1-4GlcNAc) 则需要不同的转移酶。这一概念通常被总结为一酶、一键规则。糖基转移酶不仅要识别所转移供体糖的特定糖残基，也要识别接纳体寡糖残基其他部分的性质。例如，图 1.9 中所示寡糖生物合成中，在两个不同分支上添加 GlcNAc 残基的催化剂是两个不同的 GlcNAc- 转移

构成糖苷键的总能量关系

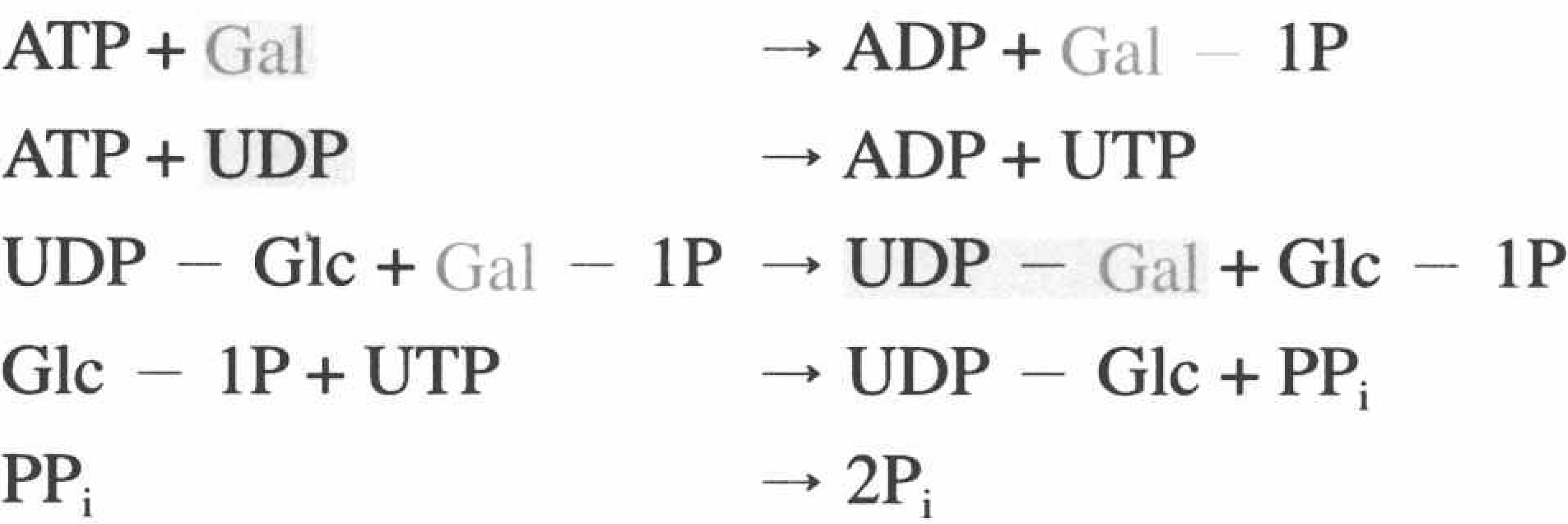


Gal + Glc	→ Galβ1-4Glc	ΔG = +3.4kcal[①]/mol
2ATP	→ 2ADP + $2P_i$	ΔG = –14.6kcal/mol



Gal + Glc + 2ATP	→ Galβ1-4Glc + 2ADP + $2P_i$	ΔG = –11.2kcal/mol

核苷酸糖供体的合成



ATP + Gal	→ ADP + Gal – 1P
ATP + UDP	→ ADP + UTP
UDP – Glc + Gal – 1P	→ UDP – Gal + Glc – 1P
Glc – 1P + UTP	→ UDP – Glc + PP_i
PP_i	→ $2P_i$



Gal + UDP + 2AYP	→ UDP – Gal + 2ADP + $2P_i$

糖苷键的形成



UDP – Gal + Glc	→ Galβ1-4Glc + UDP

图 1.10 糖苷键构成的能量关系。能量不利的糖苷键构成，最终由 ATP 两磷酸连键的水解反应驱动。这些反应与 UDP- 半乳糖合成相关。产自 ATP 的原始能量是在糖苷键形成时，由核苷酸糖供体释放出来的。ADP. 腺苷二磷酸；ATP. 腺苷三磷酸；UDP. 尿苷二磷酸；UTP. 尿苷三磷酸；PP_i. 焦磷酸

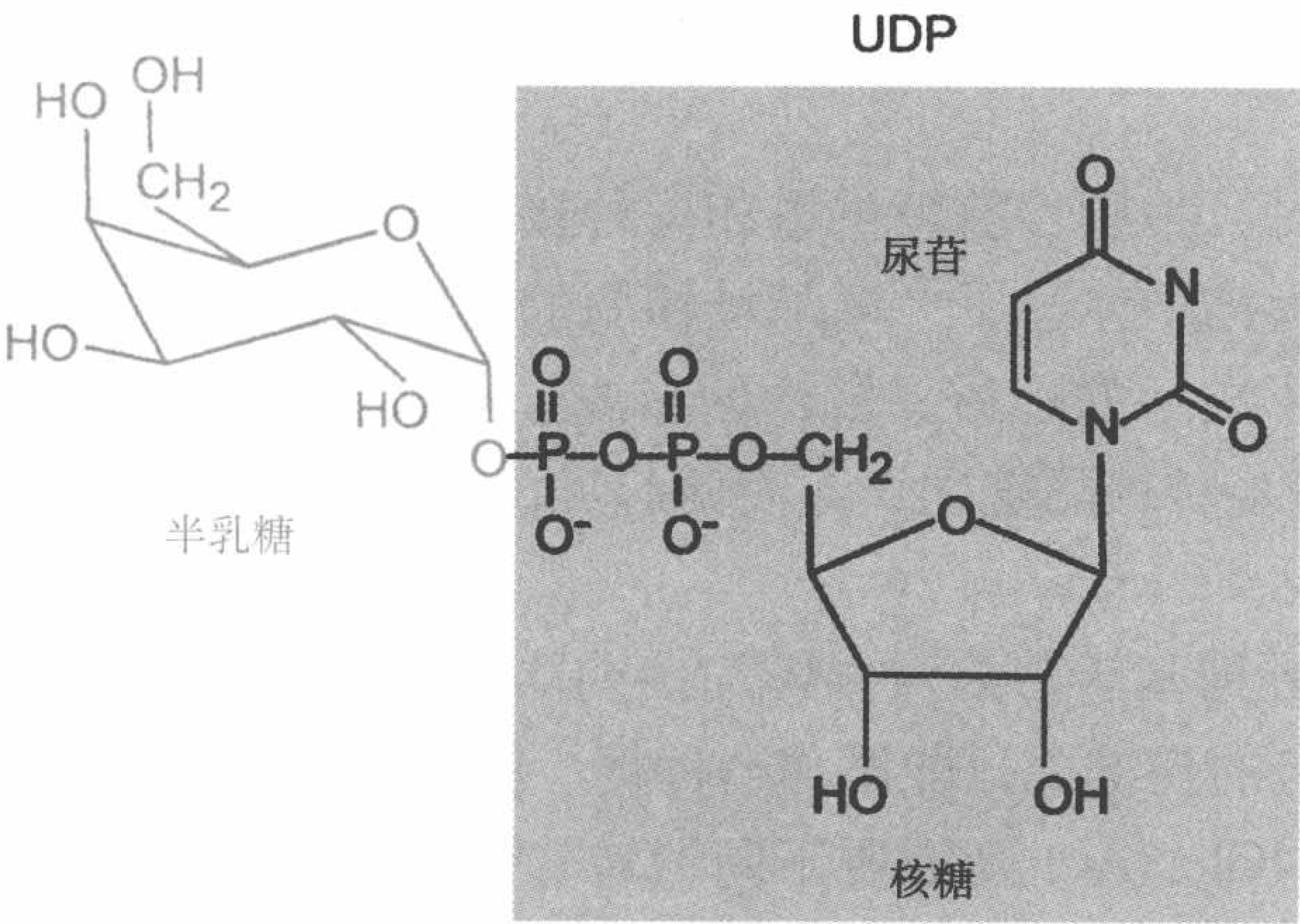


图 1.11 糖基转移酶中可作为糖供体的核苷酸糖结构。UDP. 尿苷二磷酸

① cal 为非法定单位，1cal=4.19J，全书同。

酶，这两个转移酶各自识别的不仅仅是甘露糖接纳体残基。与其相比，单用一种半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶就可以添加半乳糖和唾液酸两种残基。虽然每一种糖基转移酶都有高度的专一性，但经常发现有几个糖基转移酶具有相同或互相重叠的专一性。例如，6 种人唾液酸转移酶，其中任何一种都可以在半乳糖上催化添加 2-3 连键的唾液酸。

糖苷键的断裂也需要专一的酶，但不需要输入能量。糖苷酶（glycosidase）催化糖苷键水解反应在能量上有利。和糖基转移酶一样，糖苷酶也有专一性，一种酶只能催化含特定糖的糖苷键水解反应。例如，图 1.9 中的唾液酸酶（sialidase），也称作神经氨酸酶（neuraminidase），能够从非还原端催化释放唾液酸（NeuAc）残基。糖苷酶对某些特殊连键也具有专一性。仍以神经氨酸酶为例，有些神经氨酸酶只能水解 NeuAc 的 α2-3 连键，而另一些这种酶则可以水解 NeuAc 的 α2-3 和 α2-6 连键。

1.6 了解聚糖结构与功能间的关系比了解其他大分子困难

为思考聚糖如何行使其有用的生物学功能，将聚糖与蛋白质进行比较是一个很好的切入点。尽管蛋白质具有多样生物学功能，统一研究其性质，发现蛋白质具有两个共同的特点：第一，任何一种蛋白质都是由基因组编码的信使 RNA 翻译而来，是信使 RNA 模板的相同复本合成物；第二，蛋白质的活性都是由形成的精确折叠三维结构产生的。与之相比，聚糖是在没有模板的情况下，通过一系列个别的催化反应进行组装的。由于不同的蛋白质常由相同聚糖结构组修饰，以及某种单一多肽主链的各个复本也可以由不同的聚糖修饰，因此产生的结构是多种多样的。另外，聚糖似乎缺乏明确的折叠结构。所有这些特点使聚糖在结构与功能之间难以建立联系。在阐明聚糖功能的方式上必须界定一些新的原则。

对于特异蛋白质与特异聚糖结合，缺乏简单规则的一种解释，是因为大多数糖蛋白的蛋白质和聚糖部分的功能彼此是独立的。就是说，一种特定蛋白质的所有复本，无论与什么样的聚糖结合，其行使的功能是一样的，反之，一种特定聚糖的所有复本，即使与不同的蛋白质结合，其行使的功能也是相同的（图 1.12）。当聚糖作为可识别的标签用于主导糖蛋白运输时，这种约定特别有效。例如，糖蛋白在真核细胞分泌途径中要经历一系列质控检查。在此过程中，结合多数这些蛋白质的共有聚糖可以用来将蛋白质

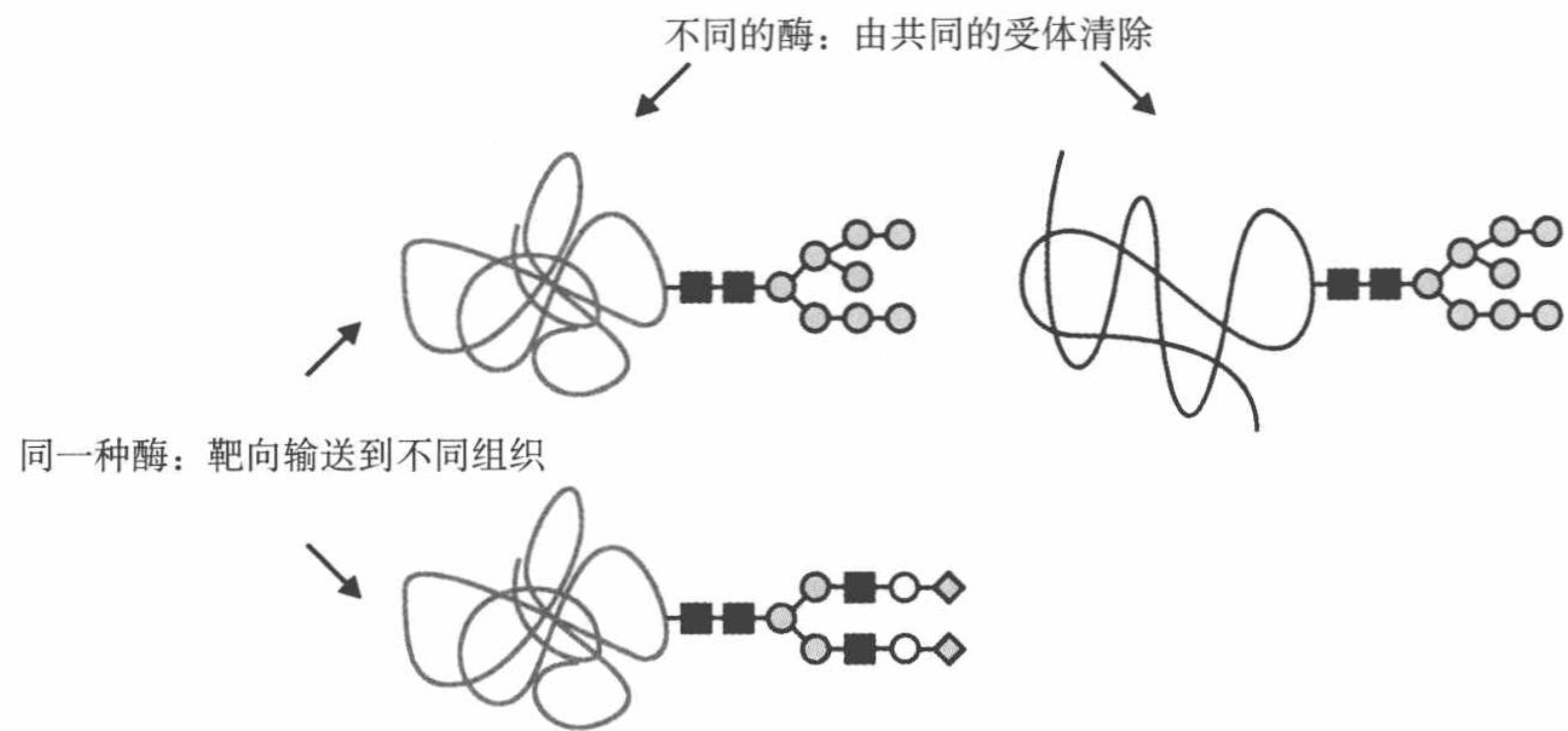


图 1.12 糖蛋白多肽和聚糖部分潜在的独立功能。不同蛋白质可以结合相同的聚糖，蛋白质的不同复本可用多种聚糖进行异质性糖基化。因此，由聚糖主导，靶向不同位点，可能与酶或蛋白质的其他功能无关

保留在适当的腔内区室。虽然蛋白质本身一旦分泌到细胞外后会有多样功能，但是还有一组聚糖能对大量不同的分泌糖蛋白起到标签作用。在这种情况下，一旦蛋白质到达细胞表面，成熟糖蛋白的聚糖部分实质上可能没有了作用。

蛋白质核心和聚糖修饰的独立功能，在有些情况下可以表现为不同形式。当特定聚糖与蛋白质或脂质在胞外质膜表面结合后，这一聚糖可以独立地介导与其结合的脂质或蛋白质载体的黏附或抗黏附事件。在各种膜糖蛋白和糖脂上出现的相同聚糖结构，可能在不需要任何相应高密度型蛋白质或脂质情况下，可为获取这类高密度结构提供一种机制。因此，在有些情况下，一些聚糖及其与该聚糖结合的蛋白质和脂质可以在彼此分离状态下进行研究。但是，在其他情况下，某一特定聚糖的功能，只能在特异糖缀合物背景下，才能搞清楚。

1.7 聚糖结构在基因组内间接编码

基因组 DNA 序列就像它们决定所有细胞组成一样，也主宰决定糖缀合物的结构。但是，糖结构不直接在 DNA 序列中编码，而是通过基因转录和翻译形成糖基转移酶，然后再控制糖缀合物聚糖部分的合成决定糖结构（图 1.13）。因此，与蛋白质生物合成比较，在解码过程中多出了一个步骤。

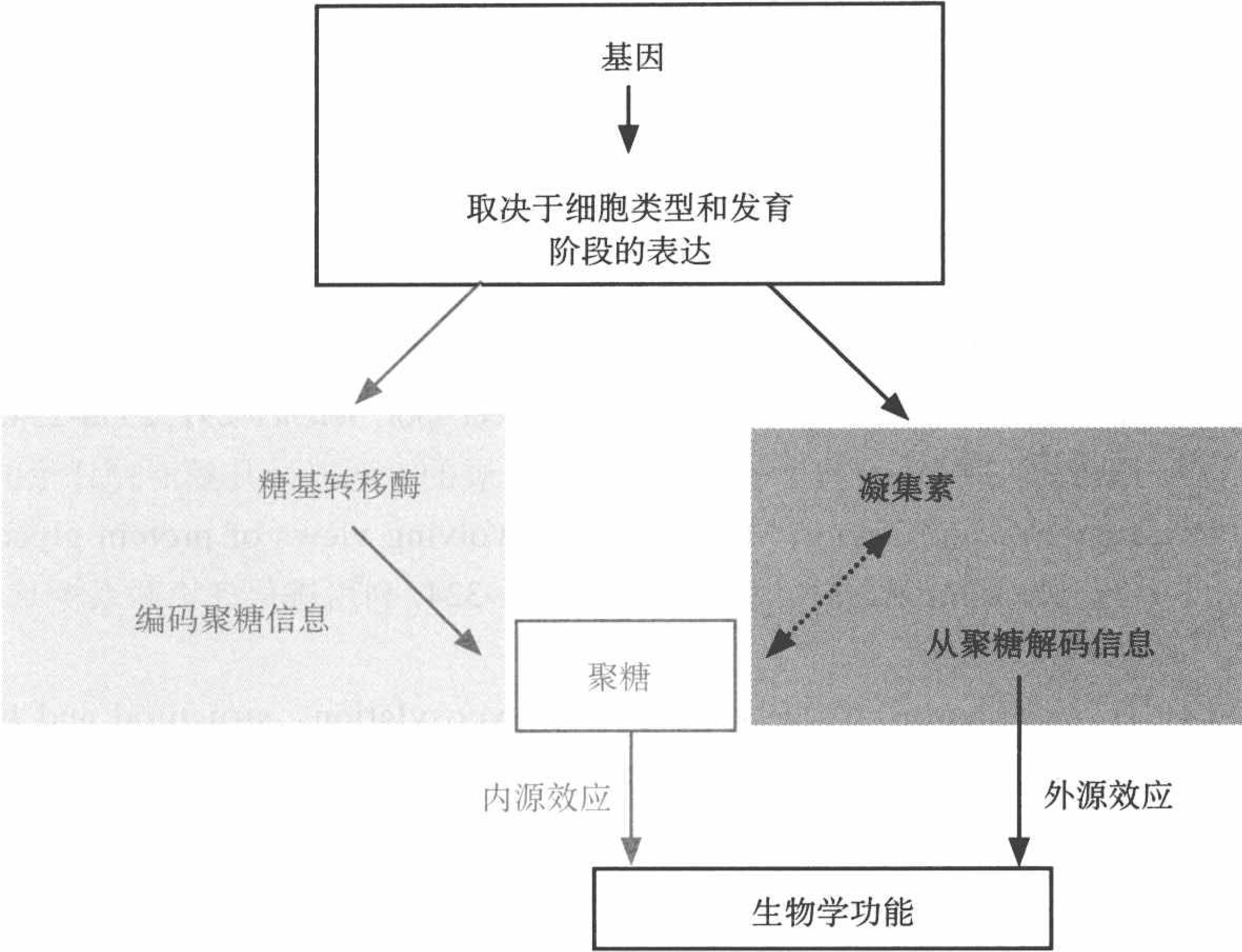


图 1.13 聚糖结构信息编码和解码步骤

根据“一酶一键”规则，最终表述特定细胞中聚糖结构的全部功能由该细胞中表达的糖基转移酶确定。

消除糖基转移酶基因的敲除小鼠技术已成为了解糖缀合物的合成及其功能的重要工具。本书引用了很多有关这方面的专业实验结果。有两项重要实验结果值得关注。第一，在早期发育阶段，完全消除任何类型的糖缀合物对有机体都是致命的，表明这些分子对有机体行使重要的生物功能。第二，缺失任何这类糖缀合物的细胞，几乎在所有情况下，都可以存活。因此，虽然糖缀合物的重要作用是在细胞背景下讨论的，然而，糖缀合物的主要功能，多数针对的不是细胞，而是有机体。

小　结

由于聚糖结构通过糖基转移酶形成，被凝集素识别，因此，糖生物学应包括对这些蛋白质和聚糖的研究。虽然有大量可能的己糖和有关结构，但只有少数这类单糖单位在糖缀合物出现。同样，单糖单位也可以通过不同的连键形式进行组合，但是这些糖基转移酶只能催化合成数量有限的一些潜在结构。然而，糖缀合物中的聚糖部分具有广泛的多样性。通常很难对特异性聚糖指定功能，

因为聚糖功能只能在有机体的背景下，而且可能还需要基因剔除技术验证才能得到证实。

主要参考文献

Alper, J. (2001). Searching for medicine's sweet spot, *Science* **291**, 2338-2343.《科学》期刊着重刊登了关于糖生物学近期进展的专题以及几篇专题评论的文章。

Drickame, K. and Taylor, M. E. (1998). Evolving views of protein glycosylation, *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 321-324. 利用进化理论联系糖基化彼此间的不同功能。

Lis, H. and Sharon, N. (1993). Protein glycosylation：structural and functional aspects, *European Journal of Biochemistry* **218**, 1-27. 除总结结合蛋白质的聚糖外，作者还对其功能提出了推测。

Roseman, S. (2001). Reflections on glycobiotogy, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41527-41542. 回顾糖类的生物化学的发展，一位这一领域的老手提出了关于目前糖基化功能的观点。

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H.H., Stanley, P, Bertozzi, C. R., Hart, G. W., and Etzler, M. E. (2008). *Essentials of Glycobiology*(2nd edn). Cold Spring Harbor,NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 这是一本综合性的糖生物学图书，详细介绍了各项专题并附有丰富的参考文献。

习 题

1.1 对比蛋白质和寡糖的结构特征。

1.2 与糖蛋白和糖脂结合的聚糖主要行使哪些重要功能？论述为什么聚糖比蛋白质更适合行使这类功能。

N- 连接糖基化

2

学习目的

学习本章后应知内容

1. 不同类型的 N- 连接聚糖结构
2. N- 连接聚糖生物合成的化学反应步骤
3. 糖基转移酶的功能
4. 生物合成步骤中细胞的区室化
5. N- 连接聚糖不均一性的原由和特点

N- 连接糖基化反应途径是了解蛋白质糖基化的最好渠道。这一反应途径可以用来阐明糖缀合物结构及其生物合成的基本原理。N- 连接糖基化途径的特性也为深入了解糖基化功能及其进化史奠定了基础。

2.1 多样化的 N- 连接聚糖共有一种核心结构

糖蛋白中 N- 连接聚糖与天冬酰胺侧链的酰胺氮结合。动物细胞中，与天冬酰胺残基结合的糖必定是 *N*- 乙酰葡糖胺（GlcNAc），而且连键通常为 β 构型（图 2.1）。这种结合方式，除异头物碳不是与糖的羟基连接，而是与酰胺氮连接外，与糖苷键相类似。这一连键可以缩写为 GlcNAcβ1-Asn。高甘露糖型 (high mannose) 和复合型 (complex) 这两种不同类型的 N- 连接聚糖都含有共同的核心结构，但从核心结构 (core structure) 延伸的末端精细结构 (terminal elaboration) 有所不同。

2.2 N- 连接聚糖组装的三个主要阶段

N- 连接聚糖生物合成途径，可以简约地分成三个阶段：

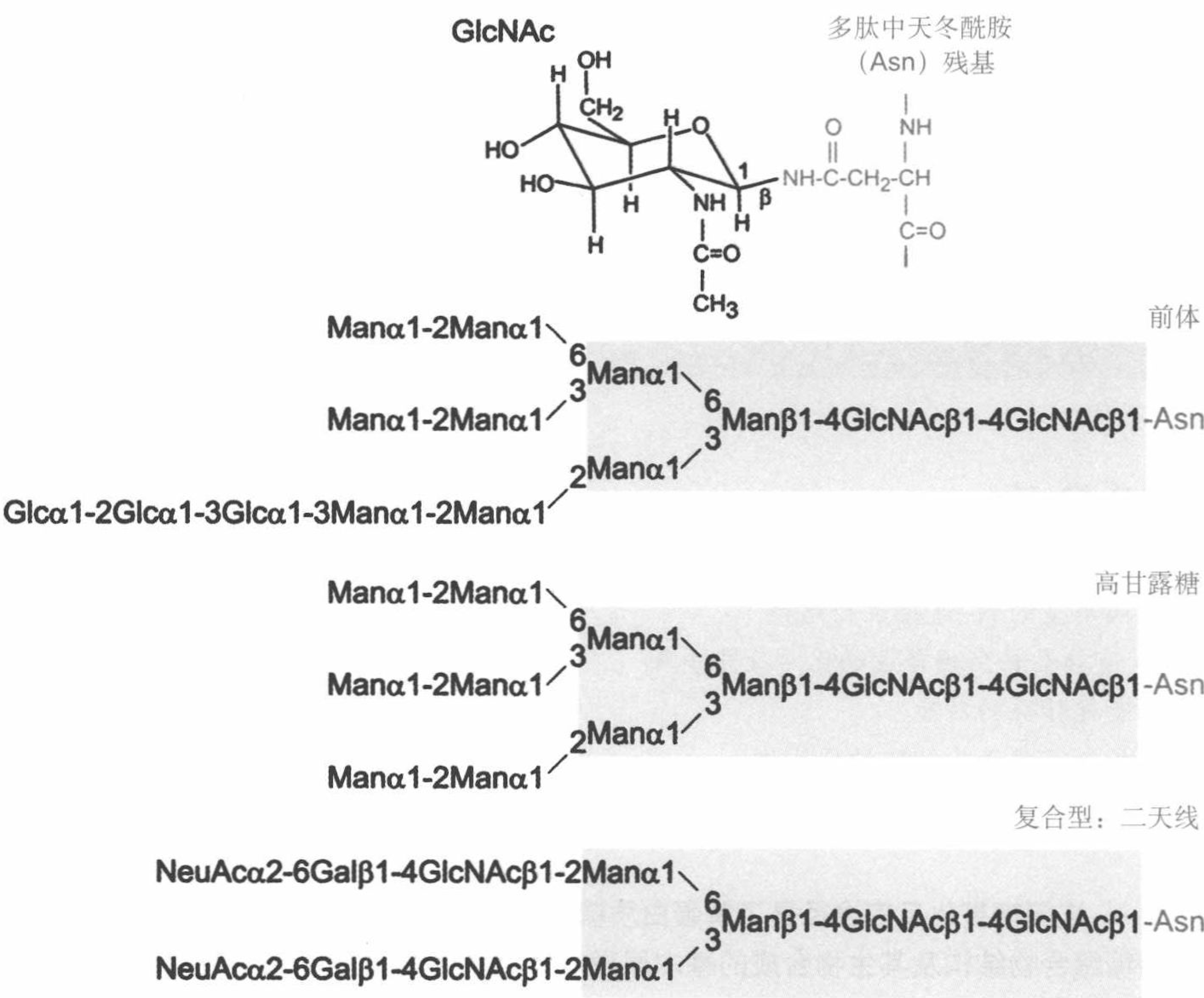


图 2.1 N- 连接聚糖与天冬酰胺残基的结合，和 N- 连接聚糖举例。底纹表示共有核心结构。由于核心中两甘露糖残基分支以不同的连键与最内侧甘露糖残基连接，通常将这两个分支分别命名为 1-3 和 1-6 寡糖分支

- 脂连前体寡糖的形成；
- 整体转移寡糖至多肽；
- 寡糖加工。

在聚糖非还原端添加新糖之后，加工阶段包括清理（剪切）某些原有的糖残基。糖蛋白在细胞内的合成步骤以发生的空间区分（图 2.2）。脂连前体寡糖的合成、聚糖整体转移至蛋白质和初始的清理剪切反应发生在糙面内质网，随后的加工步骤发生在新生糖蛋白迁移通过的高尔基体。

2.3 N- 连接聚糖的寡糖前体在脂质多萜醇上组装

启动 N- 连接聚糖合成的供体是一通过焦磷酸连键与脂质多萜醇（dolichol）结合的 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 结构 (图 2.3)。多萜醇的结构可以反

3. 加工
启动糖残基剪切
添加末端糖残基
分支结构的剪切与修饰
分泌或输送至质膜
2. 整体转移至蛋白质
合成蛋白质
1. 合成脂连前体寡糖
内质网
高尔基体
质膜

图 2.2 糖蛋白生物合成及其在细胞内的定位简图。聚糖在脂质上的组装和转移至糖蛋白这一生物合成的初始阶段发生在内质网内，随后，聚糖由糖苷酶加工，清除某些形成分支和多种末端结构添加残基的糖和糖基转移酶。这种加工事件发生在内质网和高尔基体内的特异区室

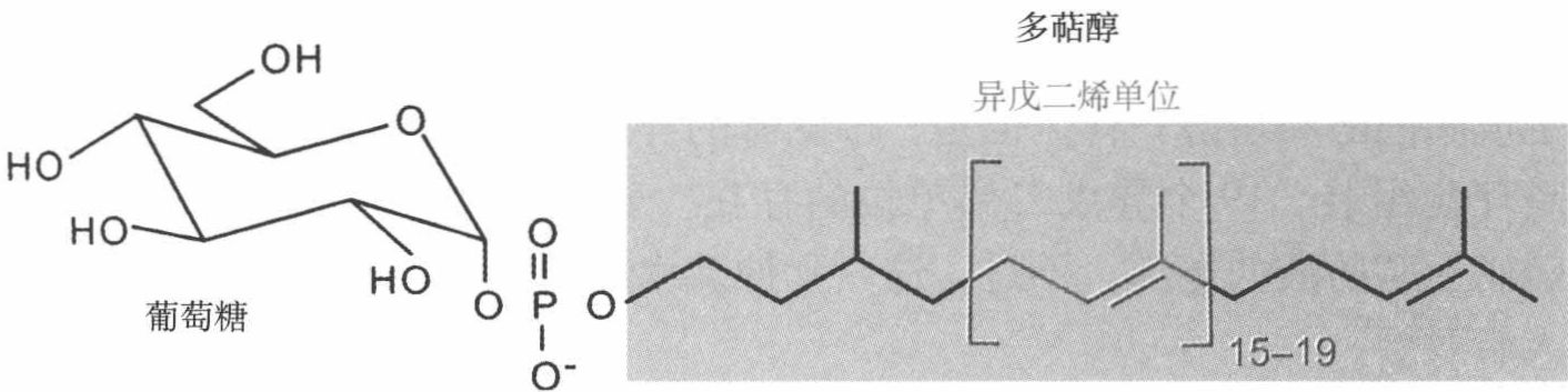


图 2.3 作为内质网膜腔内侧糖基转移酶反应供体的多萜醇糖

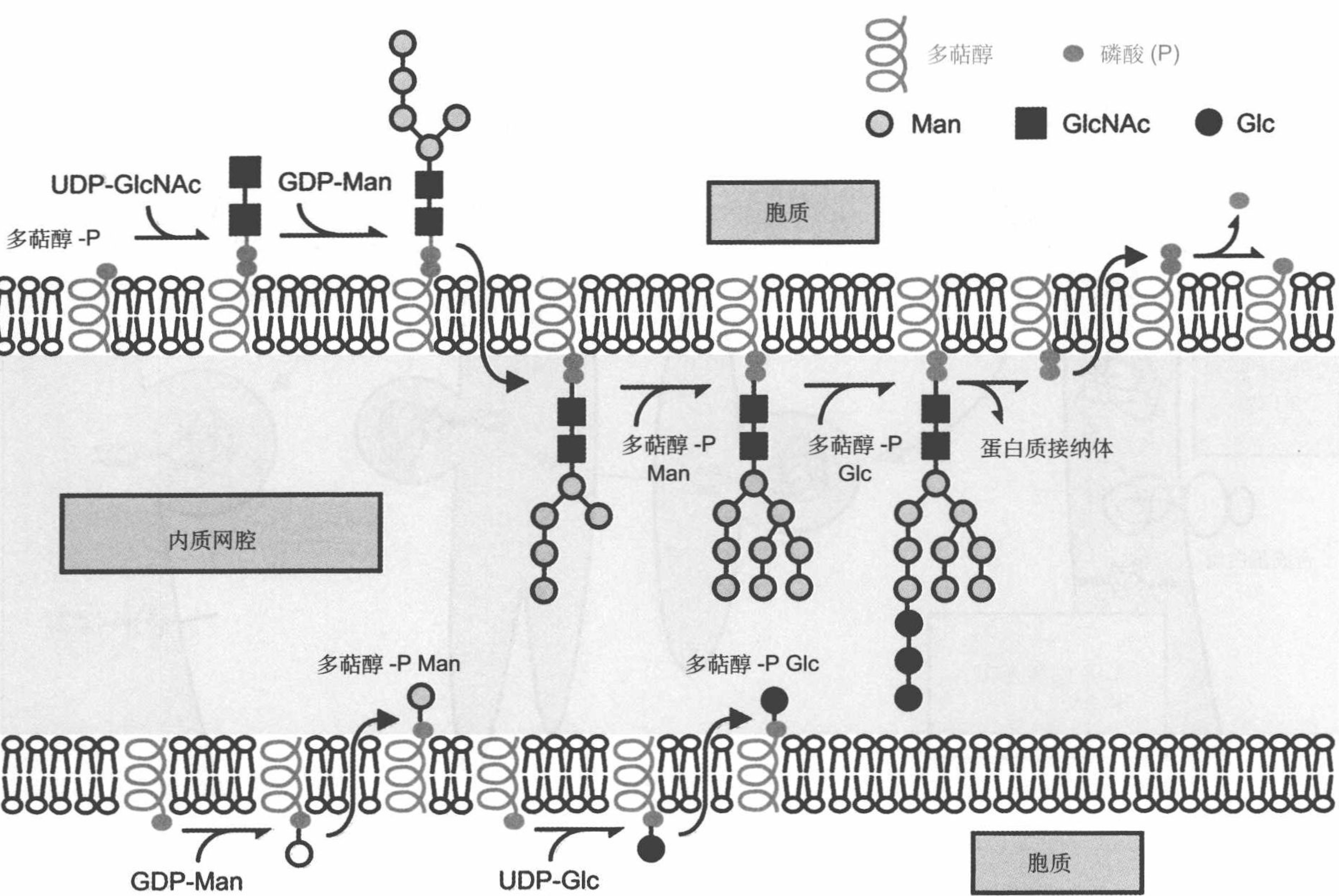


图 2.4 对蛋白质 N- 连接糖基化所需多萜醇连接寡糖供体的合成途径。在面向细胞膜胞质侧多萜醇上组装 7 个糖残基。此后，整体结构翻转至面向腔内区室。在膜腔内侧继续添加反应的糖基转移酶糖供体，也与多萜醇连接，并翻转穿越内质网膜。当聚糖与蛋白质结合以后，所释放的焦磷酸多萜醇必须翻转返回再面向胞质，完成这一循环

映出它是由五碳异戊二烯单位缩合而成，就像多萜醇与异戊二烯单位联合生成胆固醇和甾醇一样。但是，多萜醇的异戊二烯单位是端对端组装，不是环化组装。19 个异戊二烯单位的存在，表明脂质的疏水部分远长于膜磷脂上脂肪酸的尾部。不过，这一延伸疏水区很可能以螺旋或折叠构象插入脂双层。

多萜醇头部基团聚糖的组装分为两个阶段。第一阶段发生在内质网膜胞质一侧，第二阶段发生在内质网腔（图 2.4）。两个 GlcNAc 残基和最初 5 个甘露糖残基结合反应的催化酶，直接利用尿苷二磷酸 (UDP)-GlcNAc

和鸟苷二磷酸 (GDP)-Man 作为核苷酸糖供体。脂连聚糖随即穿膜易位，不再与胞质酶接触。有关易位的详细机理，有待进一步研究。

增长着的聚糖链，一旦向内质网腔内侧暴露，新生糖将继续添加。连接多萜醇的糖就成为添加最后 4 个甘露糖残基和 3 个葡萄糖残基的临近供体。脂连的这些单糖，都通过在内质网膜胞质表面的多萜醇磷酸与 UDP-Glc 或 GDP-Man 进行合成。多萜醇磷酸单糖穿膜面向内质网腔的易位，与寡糖多萜醇中间体易位相类似，对这种易位的机理同样尚未了解清楚。这些糖苷键合成反应所需的能量，来自单糖与多萜醇磷酸连接形成糖 - 磷酸键。

整体聚糖向新生多肽的转移，也发生在内质网膜腔内侧。合成 GlcNAc- 天冬酰胺连键需要的能量，同样由聚糖 - 磷酸键分解反应提供。由于聚糖焦磷酸头部基团与多萜醇连接，需要一种用于完成多萜醇循环反应的多萜醇磷酸酶，以便再生磷酸多萜醇。

2.4 连接多萜醇的寡糖前体转移到多肽的天冬酰胺残基

一般情况下，聚糖连接的天冬酰胺残基必须满足以下三个条件。

- 它们必须位于蛋白质一级结构内的特异序列。
- 它们必须位于蛋白质三维结构适当的位置。
- 它们必须出现在胞内正确的区室。

虽然曾经报道过极少数天冬酰胺在 Asn-X-Cys 或其他序列中的糖基化的例子，一般情况下，糖基化的天冬酰胺残基几乎固定不变地出现在 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 序列，其中 X 可以是除脯氨酸以外的任何氨基酸。N- 连接聚糖通常出现在蛋白质表面，而不是掩埋在蛋白质内部。最后要指出一点，N- 连接糖基化反应只在内质网腔内启动。因此，靶天冬酰胺残基常出现在分泌蛋白质和面向腔内穿膜蛋白质部分。

催化转移成熟的多萜醇结合前体寡糖至多肽接纳体的醇是寡糖基转移酶 (oligosaccharyltransferase)（图 2.5）。这种转移酶的性质阐明了糖基化的第一和最后一个条件。Asn-X-Ser/Thr 接纳体序列的必要条件取决于寡糖基转移酶的专一性。N- 连接聚糖只限于在蛋白质腔内部分出现，说明这种酶在腔内所处的位置。

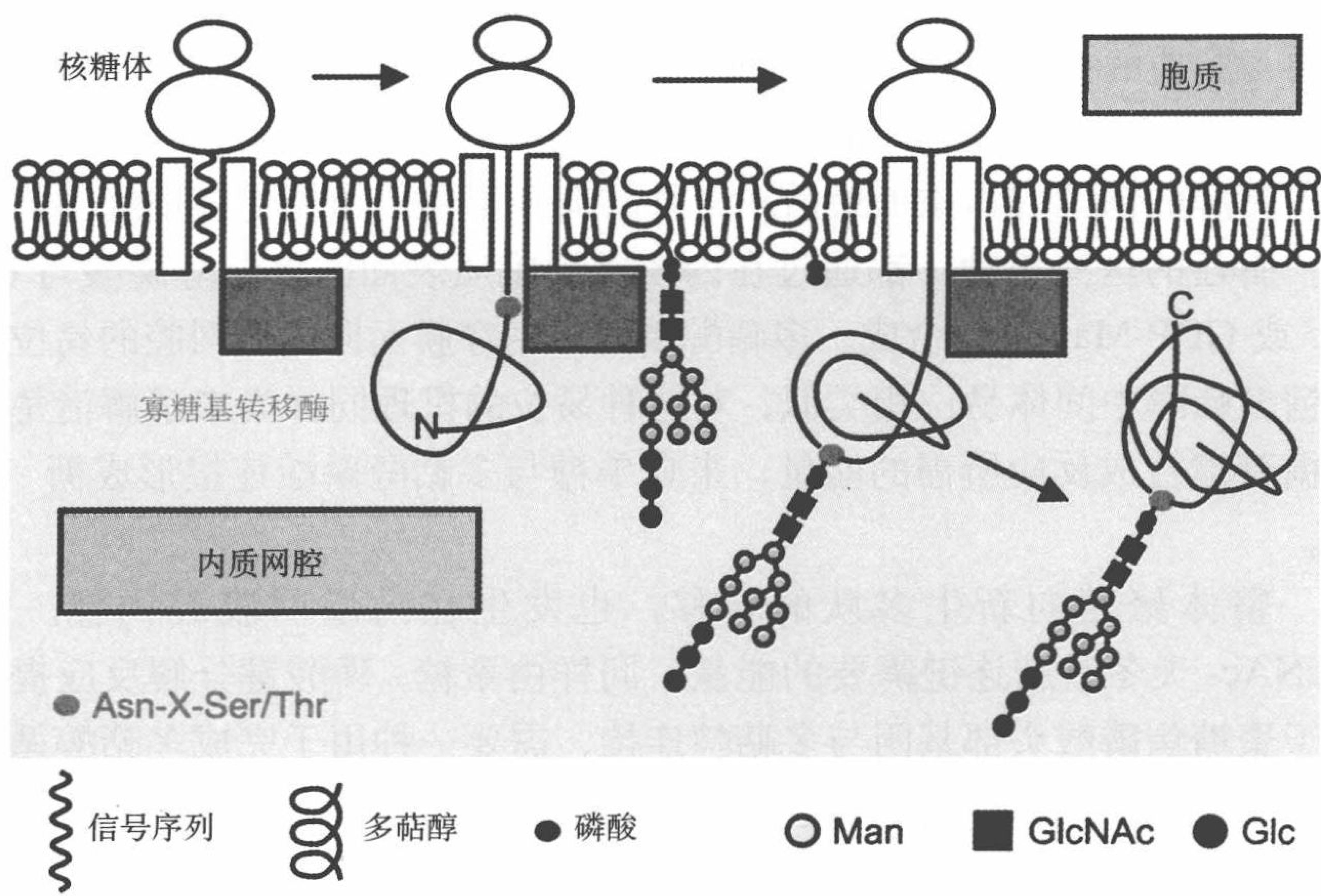


图 2.5 新生多肽共翻译添加 N- 连接聚糖。寡糖基转移酶与内质网膜上的多肽易位通道缔合，发生糖基化的同时，多肽仍未折叠。但是，聚糖最后出现在折叠的蛋白质表面

糖基化反应只发生在蛋白质表面是糖基化的第二个条件，在能量上有其合理性，因为糖类的相对极性本质，与蛋白质的疏水内部是不相容的。但是满足这一条件的机理还不清楚。常将糖基化反应称为翻译后修饰，一种形式的寡糖基转移酶与内质网膜的组分缔合，这些组分与核糖体结合，并将新生多肽从膜上易位进入腔内空间。因此，聚糖通常在新生多肽出现在内质网腔内时进行转移，是一种共翻译事件。另一种形式的寡糖基转移酶负责糖基化被前述酶错失的靶位，故此是翻译后修饰。假定两种糖基化方式都是在未折叠多肽上进行的，可以想象，任何 Asn-X-Ser/Thr 序列都将成为潜在的目标。虽然这些相对极性的氨基酸注定会出现在蛋白质表面，但也有实例中表明这些序列是掩埋的，未被糖基化。后一种情况下，快速折叠很可能阻碍了寡糖基转移酶的进入。

更多有关糖苷键参见 1.5 节。

N- 连接聚糖在转移到多肽后进行加工，首先通过加工糖苷酶清除一些糖残基。这些糖苷酶，通过添加水分子，催化能量上有利的糖苷键断裂反应。这些只对位于聚糖非还原端单糖残基起作用的酶都是外切糖苷酶 (exoglycosidase)。加工的第一阶段，剪切三个葡萄糖残基进行的同时，起始糖基化的多肽仍在内质网内。葡糖苷酶 I (glucosidase I) 负责清除末端 α1-2 连接的葡萄糖残基，清除末端残基后，葡糖苷酶 II (glucosidase II)

负责清除内部的两个 α1-3 连接的葡萄糖残基。清除最后一个葡萄糖残基后，信号示意新生糖基化的糖蛋白做好了从内质网转移的准备。监控蛋白质折叠的质量控制系统与加工反应同步进行。

●更多有关糖蛋白质量控制参见 10.2 节和 10.3 节。

2.5 修饰核心寡糖结构的糖苷酶和糖基转移酶

经过糖苷酶 I 和糖苷酶 II 催化反应后保留下来的结构，经一系列甘露糖苷酶（mannosidase）的作用，清除一些或全部 4 个 α1-2 连接甘露糖残基（图 2.6）。加工步骤在内质网内启动，并在 *cis*- 高尔基体部分继续。当糖蛋白经过腔内各区室移动至细胞表面时，某些蛋白质上的聚糖仍保持在这一加工阶段的状态。这种含 5~9 个甘露糖残基的聚糖被称为高甘露糖

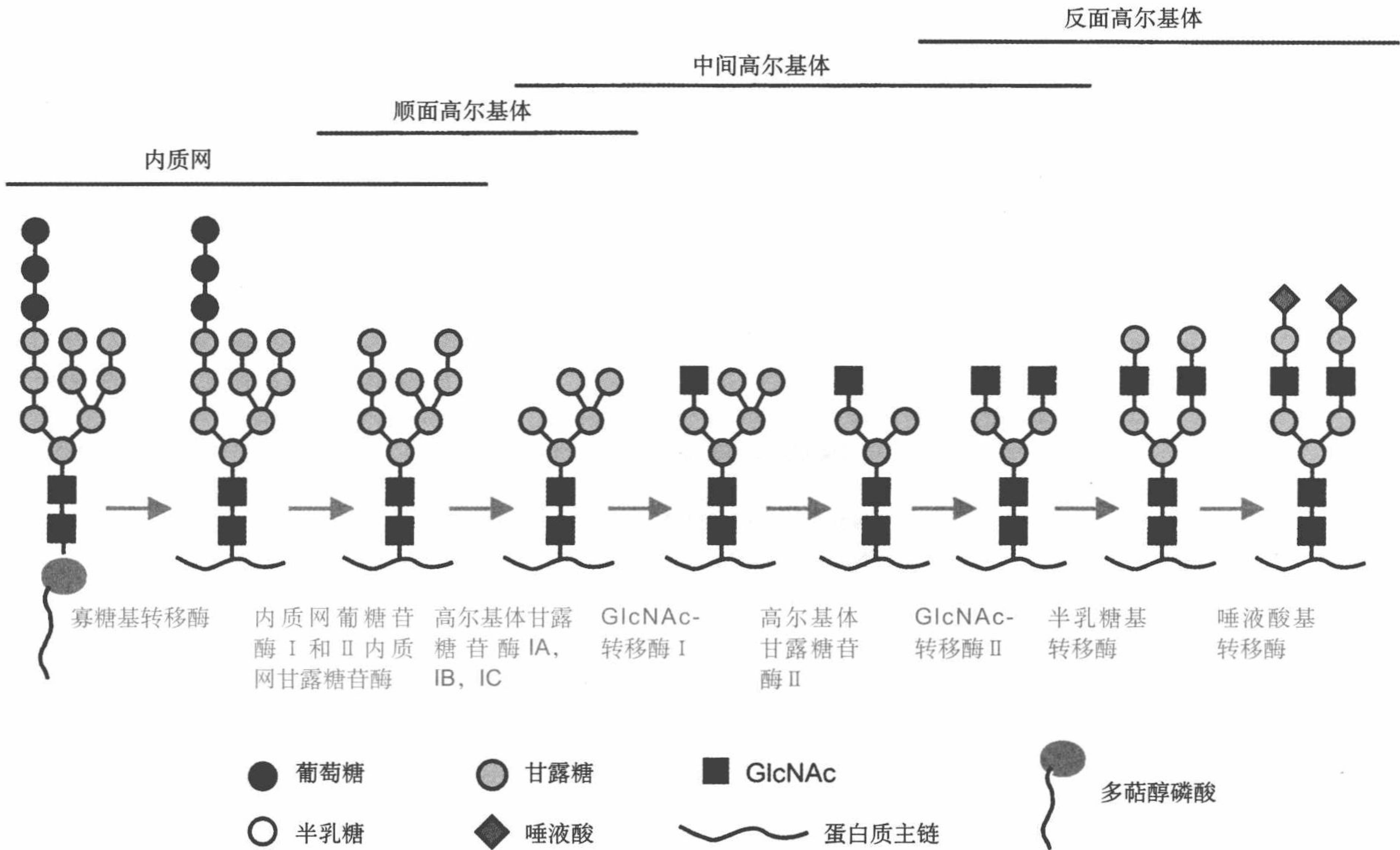


图 2.6 起始的高甘露糖型 N- 连接聚糖加工形成复合聚糖。基本加工途径包括发生在细胞不同区室一系列有序步骤。一些替代途径可通过糖苷酶消化，绕行上述步骤；或通过另一些糖基转移酶，进一步添加分支和不同的末端结构

型的寡糖（high mannose oligosaccharide）。另一些聚糖加工成为更复杂的结构。

复合聚糖 (complex glycan) 最终建构在由结合糖蛋白的 3 个甘露糖和 2 个 GlcNAc 残基组成的核心上。但是，重构过程的启动是从仍含有 5 个甘露糖残基核心的 1-3 支臂上添加 GlcNAc 残基开始的。具有再延伸能力的这一 GlcNAc 转移酶 Ⅰ (GlcNAc-transferase Ⅰ) 定位于高尔基体中央。完成添加反应后，高尔基体内的甘露糖苷酶从核心 1-6 支臂上清除另外 2 个甘露糖残基。GlcNAc 进一步添加反应分别由不同的 GlcNAc 转移酶催化，并在界定构筑核心上分支结构的同时，确定聚糖的最终结构。二天线 (bi-antennary) 结构在聚糖中最为多见，三天线 (tri-antennary) 和四天线 (tetra-antennary) 聚糖也时有发现（图 2.7）。少数含有 5 个或更多分支的聚糖，文献中也有报道。分支的典型延伸结构常在 GlcNAc 各残基上添加单个半乳糖和唾液酸残基。负责这些添加步骤的半乳糖基转移酶 (galactosyltransferase) 和唾液酸转移酶 (sialyltransferase) 定位于分泌途径的更远端，即反面高尔基体网络。半乳糖残基常定位于 β1-4 连键下方的 GlcNAc，而末端唾液酸残基既可以定位于 α2-3 连键也可以在 α2-6 连键。产生的乙酰神经氨酸－半乳糖 (NeuAc-Gal) 二糖结构通常被称为“加帽结构”（capping structure）。

更多关于糖基转移酶在细胞内定位参见 5.6 节。

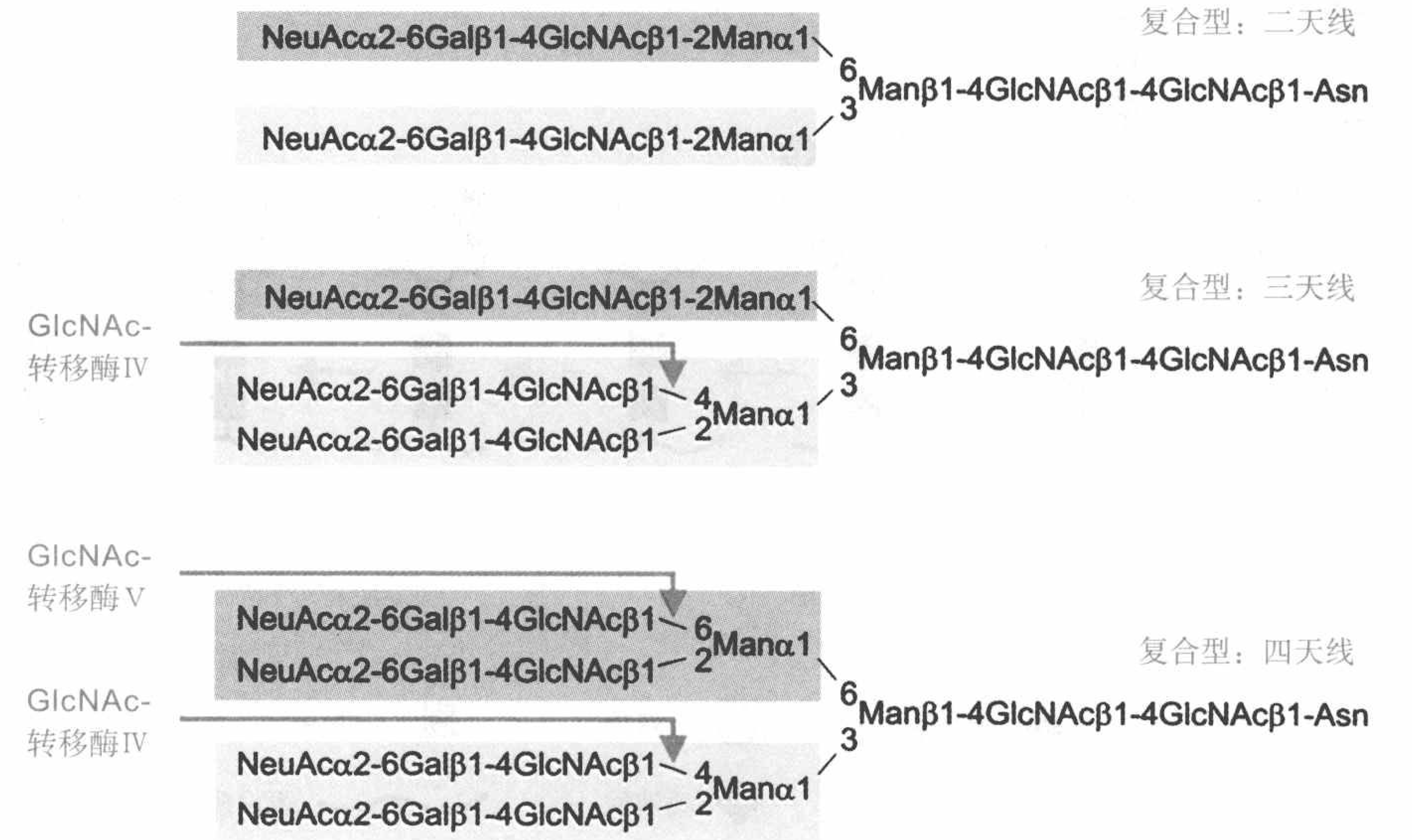


图 2.7 一些常见的复合型 N- 连接聚糖。还有一些不同形式的复合型 N- 连接聚糖也可能存在，包括载有更多分支和两个从核心 1-6 支臂，而不是从 1-3 支臂延伸的异构形式的三天线寡糖。图中标出启动形成不同分支的专一性 GlcNAc- 转移酶

在复合寡糖生物合成中添加的供体都是核苷酸糖 [UDP-GlcNAc、UDP-Gal 和胞苷单磷酸 -NeuAc(CMP-NeuAc)]。由于这些反应都发生在高尔基体腔，而供体却在胞质内形成，因此产生了拓扑学重要问题。问题在于此间并不存在用于多萜醇前体生物合成的多萜醇磷酸甘露糖中间体类似物。反而是转运体分子促使糖供体进入腔内区室。这些转运体起到了反向转运者的作用。例如，当 GlcNAc 转移到聚糖链之后，UDP 副产物即被水解成尿苷单磷酸 (UMP) 和无机磷酸盐。当 UDP-GlcNAc 被输送到腔内时，尿苷单磷酸（UMP）则转送返回胞质。

➲更多有关转运体参见 5.5 节。

2.6 杂化结构和多乳糖胺序列是核心寡糖共同的延伸

不同 N- 连接聚糖的末端残基有多种变异，核心寡糖也经常出现变型。例如，可以在核心甘露糖残基 4 位上添加等分型 GlcNAc (bisecting GlcNAc) 修饰复合聚糖（图 2.8）。核心岩藻糖 (core fucose) 残基也可以直接连接到与蛋白质天冬酰胺残基相连的 GlcNAc 上。通过 GlcNAc- 转移酶 I 添加单个 GlcNAc 残基之后，当高尔基体加工甘露糖苷酶不起作用时形成杂化结构 (hybrid structure)。在复合聚糖情况下，GlcNAc 末端分支的加工还可以继续，产生一种含半乳糖或唾液酸以及甘露糖的末端结构。

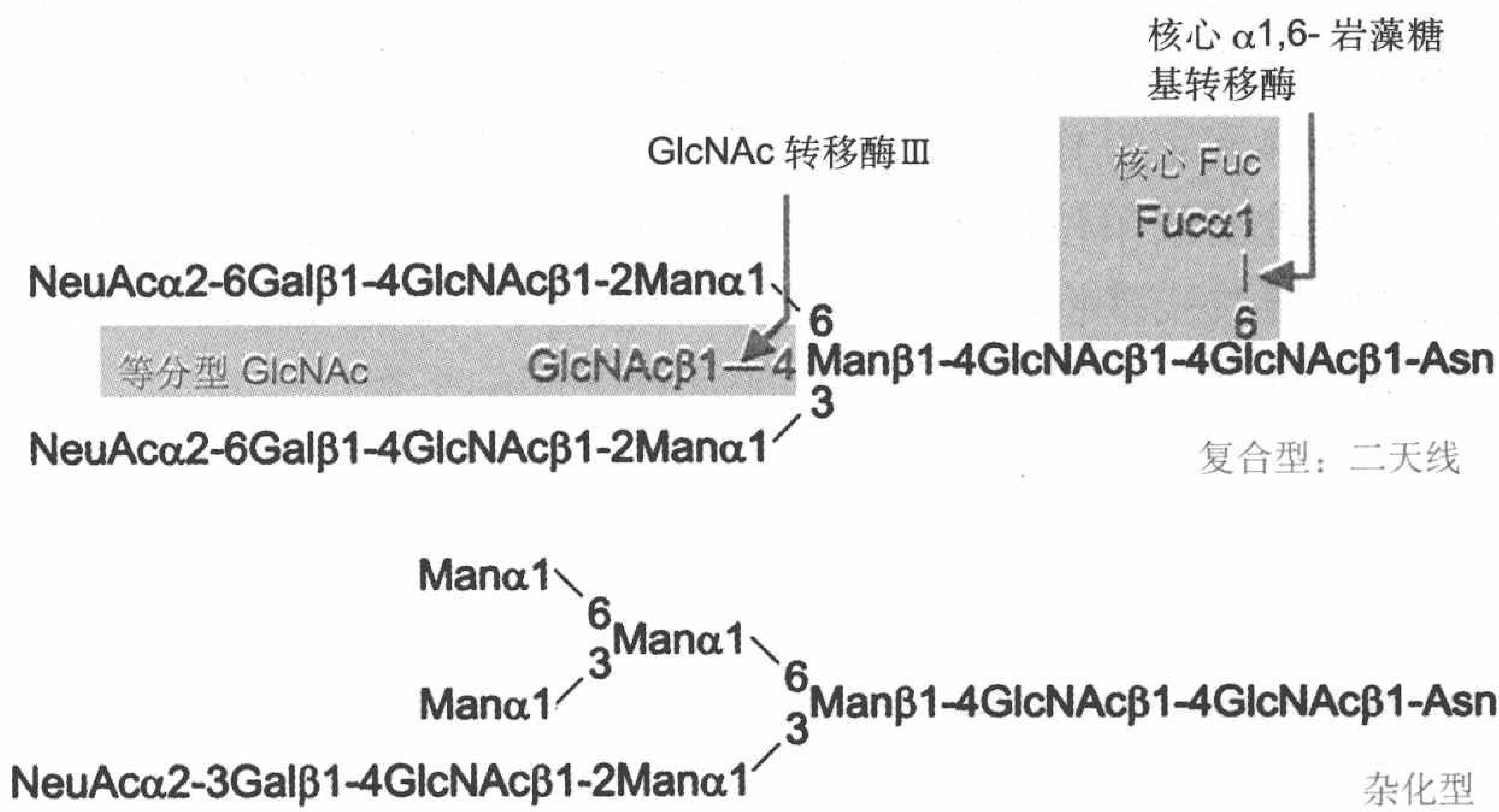


图 2.8 N- 连接聚糖结构上的变异。除新增分支产生的多样性外，有些聚糖在核心结构上添加某些糖残基，有些聚糖是高甘露糖型部分地加工为复合聚糖

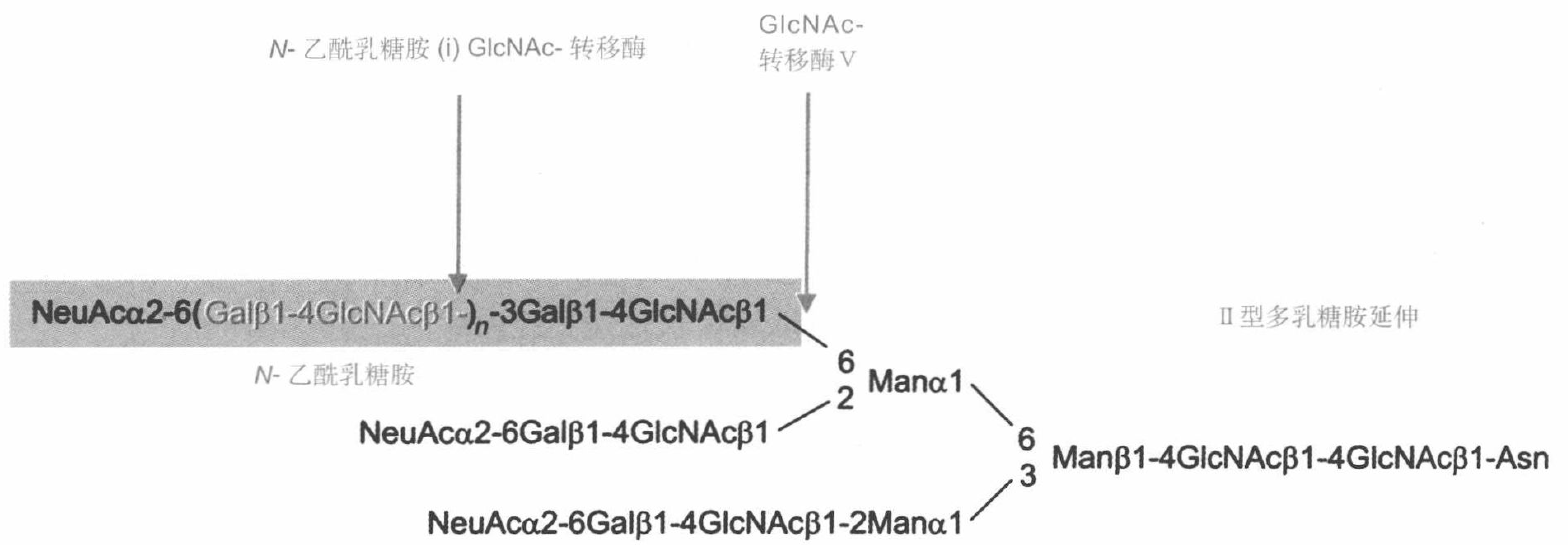


图 2.9 具有多乳糖胺延伸的 N- 连接聚糖的可能存在形式之一。由 GlcNAc- 转移酶 V 启动 1-6 分支上催化添加多乳糖胺链

核心结构上最突出的变异可能是由半乳糖和 GlcNAc 残基交替添加造成的分支延伸（图 2.9）。这个序列被看作是一系列的 Gal-GlcNAc 二糖重复，被称为多乳糖胺延伸 (polylactosamine extension)。聚糖之间的连键可能会改变，因此可能存在不同家族的多乳糖胺延伸。一种称作 2 型延伸的最常见延伸形式，其连键为 Galβ1-4GlcNAc 和 GlcNAcβ1-3Gal。通常在给定的寡糖上只有单个的聚乳糖延伸，一般情况下，都是与专一的分支连接。这一结构的合成是特异 GlcNAc 转移酶作用的结果，这种转移酶能够利用半乳糖末端分支作为接纳体。添加 GlcNAc 残基后，经过 GlcNAc 转移酶和半乳糖基转移酶重复作用形成多乳糖胺序列。与 2 型延伸链相反，在 1 型延伸中，各乳糖胺单位内的连键是 Galβ1-3GlcNAc。因为在末端半乳糖残基上添加唾液酸残基将阻止延伸链进一步延长，致使最终结构的长度取决于 GlcNAc- 转移酶和唾液酸基转移酶活性之间的平衡。

2.7 ABO 血型取决于红细胞聚糖上不同的末端糖链

聚糖上末端糖的不同结构是本书持续讨论的主题。在这一节里介绍几个阐释精细结构多样化性质的常见实例。

出现在红细胞膜外表面的 ABO 血型物质 (ABO blood group substance)，可

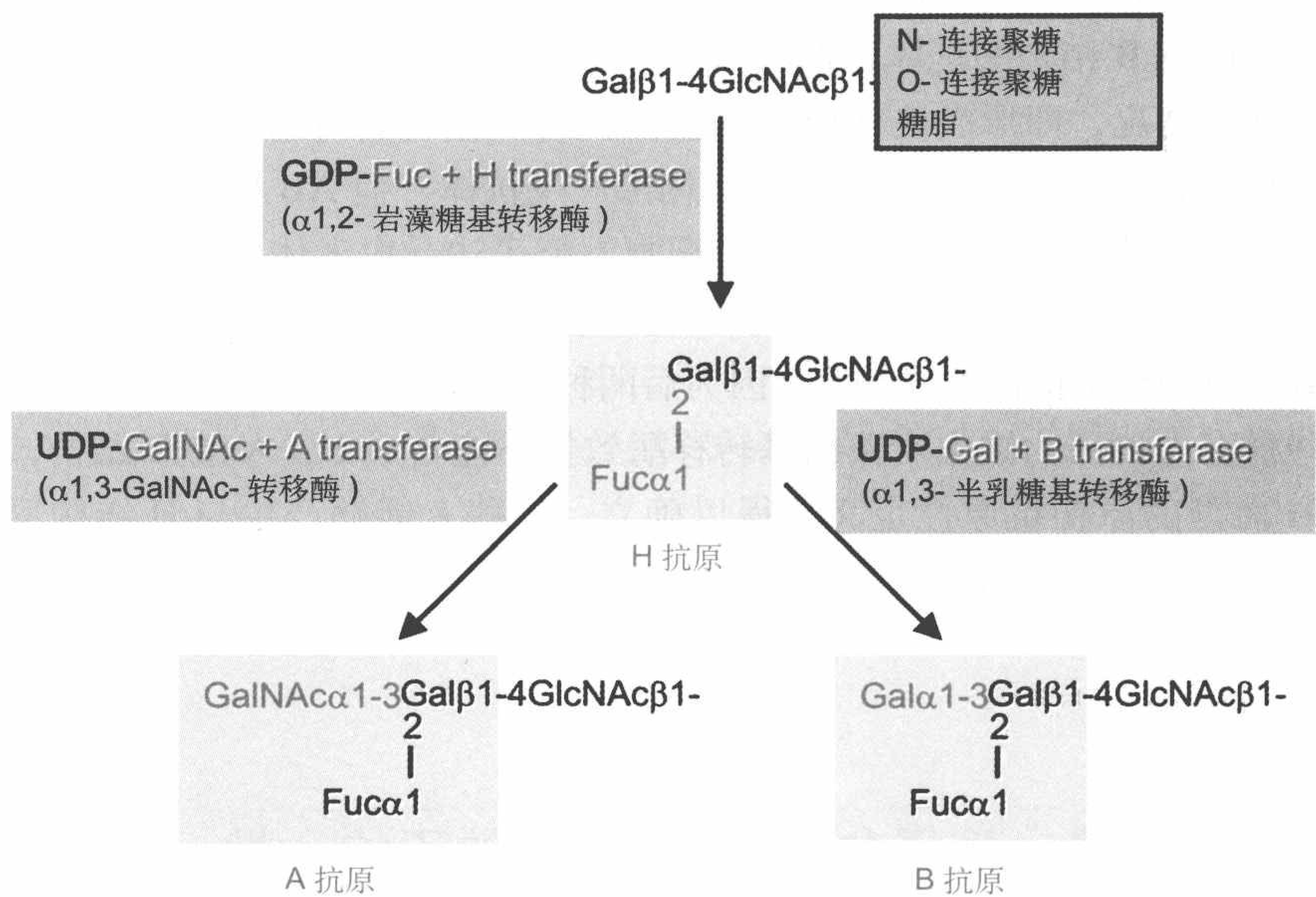


图 2.10 与 ABO 血型系统相关的末端结构。在糖蛋白和糖脂共有的 Gal β 1-4GlcNAc 添加岩藻糖之后，聚糖的最终结构取决于个体表达 A 或 B 两转移酶之一，还是同时表达 A 和 B 两种转移酶

能是人们最早知道的聚糖结构。虽然在糖脂上也出现过这种类似的结构，形成抗原 A 和抗原 B 的大多数这类寡糖是区带 3 蛋白，即红细胞阴离子转运蛋白上的 N- 连接聚糖。这种抗原聚糖通过岩藻糖基转移酶的作用，建构在多乳糖胺末端，形成 H 物质（图 2.10）。在 O 型血个体中，只有这一种修饰。A 型血个体中，在末端半乳糖残基上增加一个 *N*- 乙酰半乳糖胺 (GalcNAc) 残基，而 B 型血个体则增补一个 Gal 残基。

负责添加 Gal 和 GalNAc 残基的两个不同的糖基转移酶由 9 号染色体上单一基因座不同的等位基因编码。在 O 型个体 9 号染色体两复本的这一基因座中发现了无效等位基因，因此没有起作用的转移酶，这些个体只表达 H 物质。A 型等位基因编码 GalNAc 转移酶， B 型等位基因编码半乳糖基转移酶。具有两个 A 型等位基因或一个 A 型和一个无效等位基因的个体将展现末端为 GalNAc 的聚糖；而具有两个 B 型或一个 B 型和一个无效等位基因的个体则展现末端为 Gal 的聚糖；具有一个 A 型和一个 B 型等位基因的个体则展现两种形式的聚糖。GalNAc 和 Gal 等位基因转移酶彼此极为相似，它们之间只有一个重要的氨基酸不同。

糖生物学与疾病血型与输血

从幼年起每个人都接触 A、B、H 结构，主要通过食物接触，但是产

生的免疫应答，则由个体自身细胞表达的抗原结构性质进行调节。A 型血的人形成抗 B 结构的抗体，但对 A 结构具有耐性，反过来，B 型血的人出现同样的情况，即形成抗 A 结构的抗体，对 B 结构具有耐性。

O 型血的个体对 A 、B 两类结构都产生抗体，但 AB 型血的个体对两种结构都不能产生抗体。输入的血细胞不能表达受血者体内抗体所抗的聚糖。例如，一个 A 型血的人，可以从 A 型或 O 型供体接受细胞，但不能从 B 型或 AB 型供体接受细胞，因为后两种类型的细胞表达 B 型末端结构。一些稀有人群因为缺失岩藻糖基转移酶致使不能合成 H、A 或 B 结构，因此 H 血型的原初抗原性定义才得以确立。这些人能够产生与 H 结构反应的抗体，这些人被称为具有孟买表型（Bombay phenotype）的血型。

2.8 某个单一糖蛋白 N- 连接聚糖的不均一性

更多有关聚糖数量参见 6.5 节。

在聚糖和蛋白质结构之间缺乏联系的一个重要方面是不同拷贝糖蛋白中的天冬酰胺残基可以用不同的聚糖修饰。具有共同的多肽链，但载有不同聚糖的糖蛋白分子被称为糖形 (glycoform)。由于聚糖可能多达千余种，一种具有多个 N- 连接糖基化位点的糖蛋白就可能有数千个糖形。事实上，代表性的糖形数目还不到 100 个，而且其中主要糖形的种类只占少数。但是，蛋白质与蛋白质之间的这种不均一性的变化范围，有很大差别。

在极端情况下，有些糖基化位点只由一种寡糖修饰。例如，所有大豆凝集素蛋白的复本都具有未被进一步加工的 $Man_9GlcNAc_2$ 寡糖。在多数蛋白质中，特定的天冬酰胺残基都由特定类型的聚糖占据。小鸡卵清蛋白中，唯一的一个糖基化位点，通常结合的是杂合型或高甘露糖型聚糖，而胰脏核糖核酸酶 B 仅有一个糖基化位点，则由含 3~9 个甘露糖残基的高甘露糖型寡糖修饰。但是，核糖核酸酶的不均一性还表现为另一种形式， 如核糖核酸酶 A 是以非糖基化形式分泌。大量糖蛋白都载有复合型 N- 连接聚糖，其不均一性表现在许多方面， 如分支程度不同、是否存在核心岩藻糖和等分型 GlcNAc 残基以及聚乳糖胺延伸存在与否等。在不同复本的糖蛋白中，其特定的天冬酰胺残基可与复合型、杂合型或高甘露糖型聚糖结合，形成不同的衍生物。

有几种方式可以观察到糖基化不均一性的重要作用。多数情况下可能认为不均一性的存在无关紧要。聚糖没有专一性的功能，或者，它只能通过其共有或保守部分起某种作用。像蛋白质多数氨基酸的多态性一样，糖

基化的变异性（虽然有些极端）主要显示为一中性进化过程。另外，这种不均一性，至少在某些例子中，可能受正选择支配。糖基化反应可能对蛋白质的某些性质产生影响，不同的糖基化对蛋白质性质的影响也有不同。但是，很难证明因糖基化不均一性引起生物学重要作用的变化幅度。最后一点，细胞表面不均一性糖基化的进化压力，可能是由病毒和毒素通常利用聚糖作为结合细胞的工具这一事实引发的。虽然，更加多样化的细胞表面聚糖组合可降低病原体可利用靶标的均一性，但这种现象同样难以量化。

➲更多有关糖基化对蛋白质的影响参见第 8 章 。

2.9 结合糖蛋白 N- 连接聚糖的性质取决于其所得以表达的蛋白质和细胞

糖基化的多样性受几种因素控制。第一，多肽序列与其结合聚糖结构之间虽然没有简单的一对一的关系，但蛋白质结构对糖基化的作用具有一定的影响。包括高甘露糖型和复合型在内的常见 N- 连接结构，常出现在许多糖蛋白上，似乎代表着默认形式的糖基化，但某些末端精细结构只在某些糖蛋白亚类上出现。与这些蛋白质结合的聚糖修饰，至少部分地是由蛋白质结构特性规定。在以后各章中将讨论这方面的例子，包括与聚糖结合的甘露糖 6- 磷酸、$GalNAc_4$-SO_4 和血型物质。第二，在有些蛋白质内某些糖基化位点的位置有利于 N- 连接聚糖加工为复合寡糖，而在其他位点结合的聚糖仍保持为高甘露糖型结构。最后，在不同类型细胞中表达的、或在同一类型细胞的不同生长条件下表达的同一种蛋白质，均可按不同方式进行糖基化。在不同类型细胞中表达的不同糖基转移酶组，也可能引发糖基化的某些变化。还有一些区别反映了糖蛋白沿分泌途径移行的速度不同，由此决定了糖蛋白与糖基化装置各局部区域的接触时间的长短。当正常组织细胞与来自同一组织的肿瘤细胞进行比较时，就会遇到糖基化差异的极端例子。不同物种的细胞在其细胞表面也会将不同的聚糖附着到相似的蛋白质上。

➲关于甘露糖 6- 磷酸和 $GalNAc_4$-SO_4 的生物学功能参见 10.5 节和 10.9 节。

➲有关肿瘤细胞糖基化的更多情况，参见 13.7 节和 13.8 节。

2.10 高甘露糖型结构出现在低等真核生物，但糖基化装置已进化到在高等生物中产生复合聚糖

N- 连接糖基化途径的一个显著特征是这一途径在合成多数糖蛋白

的聚糖上似乎不是一个很有效的路线。合成复合聚糖的路线好像特别迂回曲折。对此情况有关的两点解释将在以后的各章中进一步讨论。第一，由甘露糖和 GlcNAc 构成的哺乳动物糖蛋白的核心结构经常是比较简单的真核生物的最终产物。酵母和真菌的核心结构是通过延伸形成的，不是经加工形成的，而且这些核心结构形成这些单细胞真核生物的外壁，起结构性作用。因此，高甘露糖结构成为更加复杂的聚糖的进化性前体，和形成适应多细胞生物识别目的所需更为复杂精细末端聚糖先行存在的合成途径。第二，当糖蛋白在分泌途径的早期区域内移行时，糖蛋白上出现初始的均匀核心结构，当糖蛋白接近细胞表面，继续进行这一核心的修饰。这一空间的差异显示糖蛋白的聚糖部分在细胞内部可能有不同的功能，这些功能与蛋白质折叠和细胞内运输有关，而在细胞外部，聚糖可能参与识别事件。

➡更多有关聚糖识别生物学参见第 9 章和第 10 章。

小　结

N- 连接聚糖和形成 N- 连接聚糖的生物合成途径已成为我们了解哺乳动物糖生物学的基础。尽管 N- 连接聚糖有多种变化，但所有糖蛋白的 N- 连接聚糖都是通过一条共同的从内质网启动的合成途径形成的，并在新生多肽链内将预先形成的寡糖转移到新生多肽链 Asn-X-Ser/Thr 序列中的天冬酰胺残基。高甘露糖型、复合型和杂合型这 3 种主要的 N- 连接寡糖都是在高尔基体内通过糖苷酶和糖基转移酶作用形成的。受专一性限制的这些糖苷酶和糖基转移酶都要按规定顺序发挥作用。在特定糖蛋白上出现的结构主要由合成糖蛋白细胞中表达的糖基转移酶决定。由于一系列不同的寡糖都可能与某一个特定的天冬酰胺残基结合，因而多数糖蛋白都是不均一性的。在多数这种情况下，个别寡糖结构的出现，可能不具备特定的功能。在随后的章节中将阐释一些非常特殊的，在核心结构添加一些非常具有专一性的末端精细结构，介导在识别和其他过程中的特殊功能。通过调控糖基转移酶的表达和活性，了解选择性糖基化如何发生，仍然是未来研究的重要方向。

主要参考文献

Abeijon, C. and Hirschberg, C. B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplas-mic reticulum, *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 32-36. 这篇论文讨论了发生在内质网内糖基化反应的复杂性，附有蛋白质和供体糖需要从胞质移位的特殊文献。

Burda, P. and Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation, Biochimica et Biophysica Acta **1426**, 239-257. 本篇论文对 N- 连接寡糖脂连前体的生物合成给出了详细的评论。

Greenwell, P(1997). Blood group antigens：molecules seeking a function?, *Glycoconjugate Journal* **14**, 159-173. 对形成血型抗原糖结构的可能性作用进行了评判性的回顾。

Knauer, R. and Lehte, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast, *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**, 259-273. 详尽地评论了寡糖基转移酶的生物合成。

Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annual Review of Biochemistry* **54**, 631-664. 对 N- 连接聚糖生物合成经典的总结。

Muramatsu, T.(2000). Essential roles of carbohydrate signals in development. immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting, *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **127**, 171-176. 此论文从敲除小鼠表型对寡糖功能得出的结论提出评论。

Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., and Gilmore R. (2009). Cotranslationa and posttranstational N-glycosytation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms, *Cell* **136**, 272-283. 阐释共翻译和翻译后两种寡糖基转移酶不同形式的不同功能。

Zielinska, D. F. , Gnad, F. , Wiśniewski, J. R. , and Mann, M. (2010). Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topology and sequence constraints, *Cell* **141**, 897-907. 一种确证 N- 连接糖基化靶序列和糖基化位点拓扑性限制的蛋白质方法。

习　题

2.1 描述 N- 连接寡糖加工过程出现的两类反应。从底物要求的角度说明糖苷酶和糖基转移酶之间有何异同?

2.2 解释 N- 连接寡糖加工过程中，为什么需用两种不同的糖苷酶和几种甘露糖苷酶清除葡萄糖和甘露糖残基?

2.3 曾采用糖苷酶和糖基转移酶抑制剂研究 N- 连接糖基化途径，如果采用下列抑制剂处理，从细胞系分离的糖蛋白上，预测会出现怎样的 N- 连接寡糖结构?

a 卡斯塔碱 (castanospermine)，一种葡萄糖苷酶 I 抑制剂；
b 脱氧野尻霉素 （deoxynojirimycin），高尔基体甘露糖苷酶 I 抑制剂；
c 苦马豆碱 （swainsonine），高尔基体甘露糖苷酶 II 抑制剂。

2.4 参与 N- 连接糖基化合成途径酶的基因敲除小鼠，曾用于研究寡糖功能。

敲除 GlcNAc 转移酶 I 的小鼠，胚胎发育的第 9 天死亡。缺失 ST6Gal- 唾液酸转移酶（一种在半乳糖上添加 2-6 连接唾液酸的转移酶）基因的小鼠可以存活、繁育，但在建构免疫应答能力方面有缺陷。从这些小鼠分离的糖蛋白上，预计会出现怎样的寡糖结构？从这些小鼠的表型中，对不同 N- 连接寡糖的生物功能可以得出怎样的结论？

2.5 某种分泌蛋白质的 cDNA 序列显示含有两 Asn-X-Ser/Thr 模体，但对蛋白质的糖基化一无所知。如果你认为这些位点中，其中一个或两个位点皆可以糖基化，而且寡糖加工成 Man_5 高甘露糖结构，或者加工为唾液酸化复合型二天线结构，这种蛋白质可能有多少糖？阐释这样的蛋白质为什么能有非常多的糖？

2.6 与铁结合的转铁蛋白（transferrin）在肝脏中合成，分泌到血清。转铁蛋白有两个 N- 连接糖基化位点。对人血清转铁蛋白的分析表明，其中含有唾液酸化二天线和三天线复合寡糖混合物。如果在哺乳动物细胞系表达转铁蛋白，预计这种重组形式的转铁蛋白与天然形式的血清一样吗？有哪些因素导致这两种形式的糖基化有所不同？

O- 连接糖基化

3

学习目的

学习本章后，应知内容：

1. 黏蛋白型聚糖结构及其在多肽上的组织方式
2. 糖胺聚糖的结构和生物合成及其在蛋白聚糖中与核心多肽的结合
3. 黏蛋白和蛋白聚糖在保水和组织结构中的功能
4. 胞质和细胞核糖基化的特殊性质

黏蛋白和蛋白聚糖这两组糖蛋白的性质，受糖蛋白所载有的大量 O- 连接聚糖支配。本章主要讨论这两类糖蛋白，以及糖基化如何赋予糖蛋白适合于行使其重要生物学功能的物理性质。包括一些起结构作用和其他一些具有通讯功能极为多样的 O- 连接糖基化反应已得到承认。对这样一些 O- 连接聚糖的较为深入的功能也选择性地进行了讨论。

3.1 黏蛋白是可保水的、巨大和高度 O- 连接糖基化蛋白质

黏蛋白（mucin）的主要用途是为暴露在环境的表面保水，这种表面与皮肤中的保水不同，未被水分防透层封闭。因此，黏蛋白必然出现在消化道、生殖道和呼吸系统表面。唾液、胃液、肠液、阴道和鼻腔黏蛋白的特征是附着了糖类的多肽骨架各不相同。在丝氨酸和苏氨酸残基组上面，添加簇聚的唾液酸化聚糖导致形成强力负电荷区，赋予黏蛋白具有结合大量水的能力。由于这种高度水合结构，从黏蛋白释放水所消耗的能量，降低了蒸发速度。黏蛋白的糖基化以一组相对简单的核心结构作为基础，核心结构中 *N*- 乙酰半乳糖胺（GalNAc）与丝氨酸或苏氨酸侧链连接，并载

有形成核心结构 1（core 1）的 β1-3 连接的单个半乳糖残基（图 3.1）。附着在黏蛋白多肽上的典型的 O- 连接聚糖由二唾液酸化形式的核心结构 1 组成。

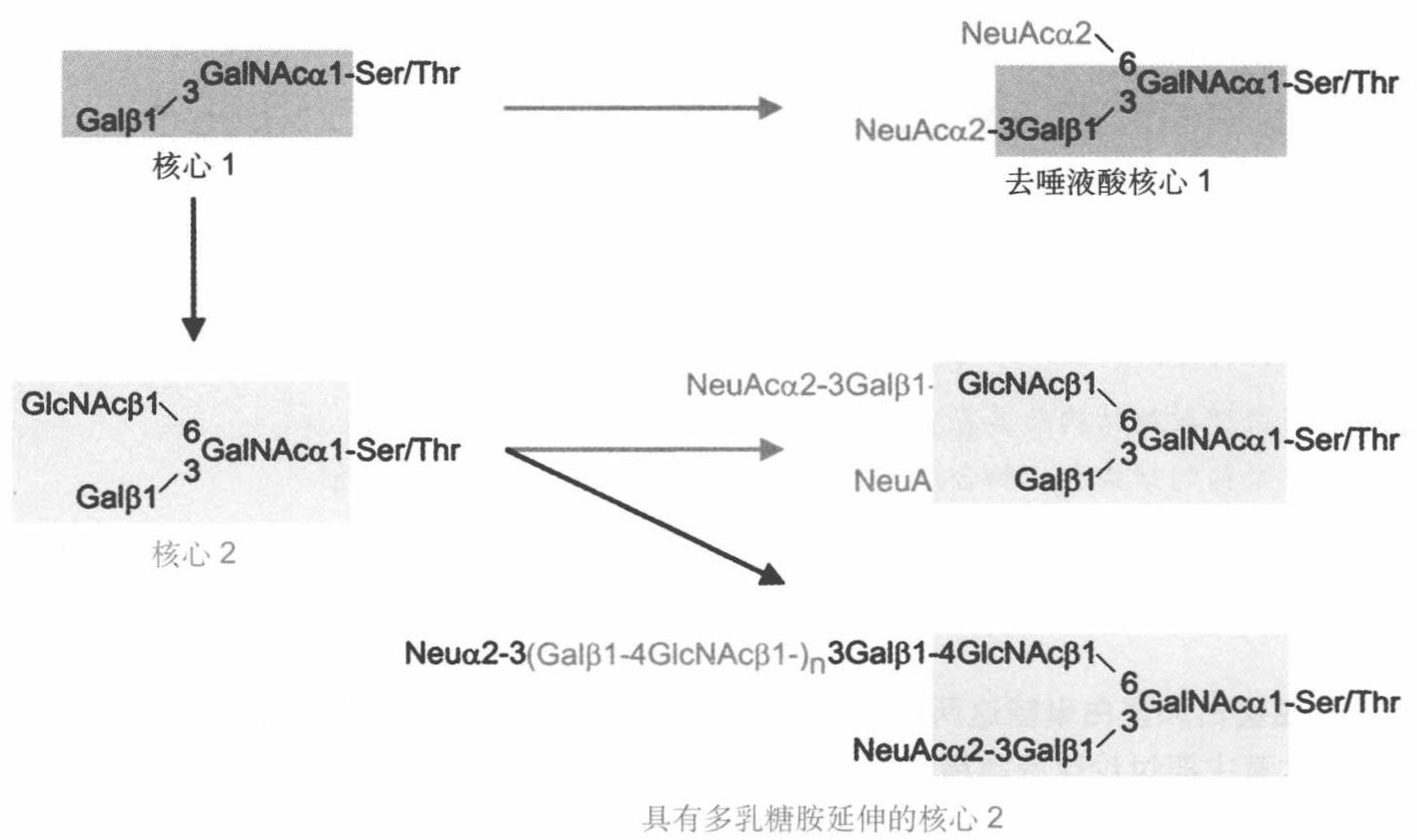


图 3.1 通过 GalNAc 残基结合丝氨酸和苏氨酸侧链的核心 1 和核心 2 结构。在黏蛋白和其他糖蛋白中可以观察到这种被称为黏蛋白型的 O- 连接糖基化

编码人类黏蛋白核心多肽可能有多达 19 MUC 基因。黏蛋白除有助于保水外，还有润滑和防止微生物入侵的作用。黏蛋白多肽的结构特征显示这些不同的功能。这些多肽链的长度非常特殊，含有多达上万个氨基酸，可以与膜结合，或者被分泌。每一多肽链都含有相对简单的富含丝氨酸和苏氨酸的串联重复氨基酸序列，这些序列都是 O- 连接聚糖潜在的结合位点（图 3.2）。这类串联重复序列在类型和物种不同的黏蛋白间均有所不同，但在同一物种专一黏蛋白基因内是相同的或基本相同。黏蛋白基因中可能有 100 多个这样的串联重复序列复本。不同个体中这类多态性基因的重复序列数目常有不同。在串联重复序列外面，单一序列区还会在其他 O- 连接和 N- 连接糖基化中出现。

整体黏蛋白的分子，通过形成二硫键连接寡聚体而增大。分泌型黏蛋白多肽的末端球形结构域支配着大于 1MDa 共价复合体的形成（图 3.3）。由于容纳庞大的聚糖的需要和唾液酸残基间的电荷排斥，黏蛋白密集的糖基化导致形成多肽延伸构象。体积庞大、长度延伸的糖基化黏蛋白寡聚体，赋予水合糖蛋白润滑作用不可缺少的特殊黏弹性能。通过二硫键使分泌的

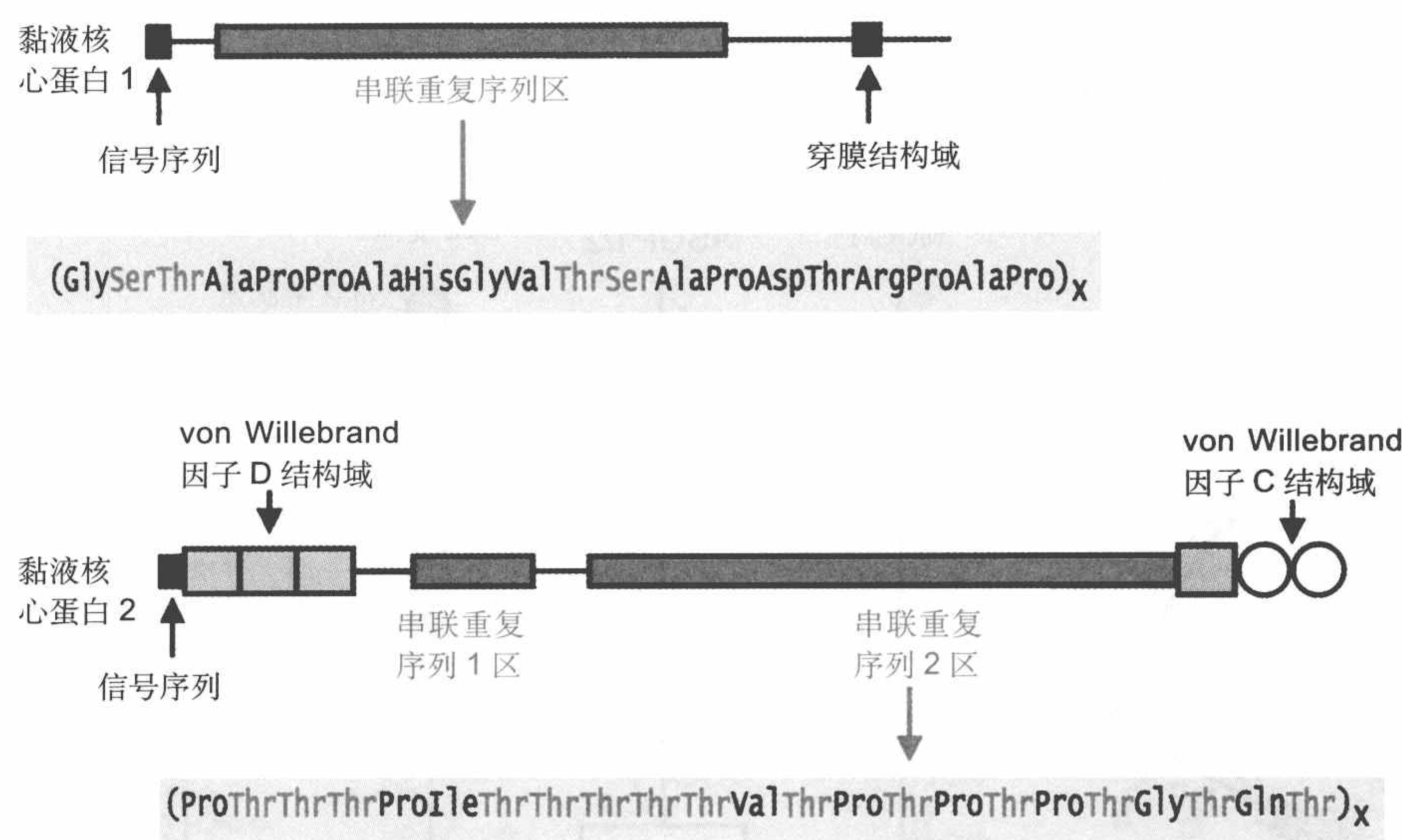


图 3.2 两种黏蛋白串联重复序列整体组织形式举例。串联重复结构域的两翼独特序列具体分派了分泌、膜插入、寡聚化和结合细菌的各种功能。蓝色表示糖基化区域

MUC-2 多肽彼此连接形成分支结构。这种交叉连接的水合性长链聚合体，形成类似于鼻腔分泌物一样的凝胶。

黏蛋白以两种方式产生抗菌性。黏蛋白黏液和凝胶的机械性质可以作为诱捕潜在病原体的陷阱，在其进入人体之前就可以从黏蛋白表面上清除。另外，有些末端结构域，对细胞表面细菌有一种特殊的亲和力，可以增强诱捕作用，还可以强化对所捕获病原体的免疫应答能力。细胞表面黏蛋白可能是膜整合多肽，或者这类黏蛋白通过末端球形域可以与膜整合多肽缔合。细胞表面的黏蛋白，除具有分泌黏蛋白同样功能外，还可以调节细胞间的黏附作用。

有关黏蛋白和癌症的信息参见 13.8 节。

3.2 细胞表面有些蛋白质具有黏蛋白样结构域

黏蛋白样结构域也在含有球形域的穿膜蛋白中出现（图 3.3）。这种黏蛋白样结构域通常定位于膜锚和球形域之间。在低密度脂蛋白受体（receptor for low-density lipoprotein）出现过这种配置形式，位于这一受体

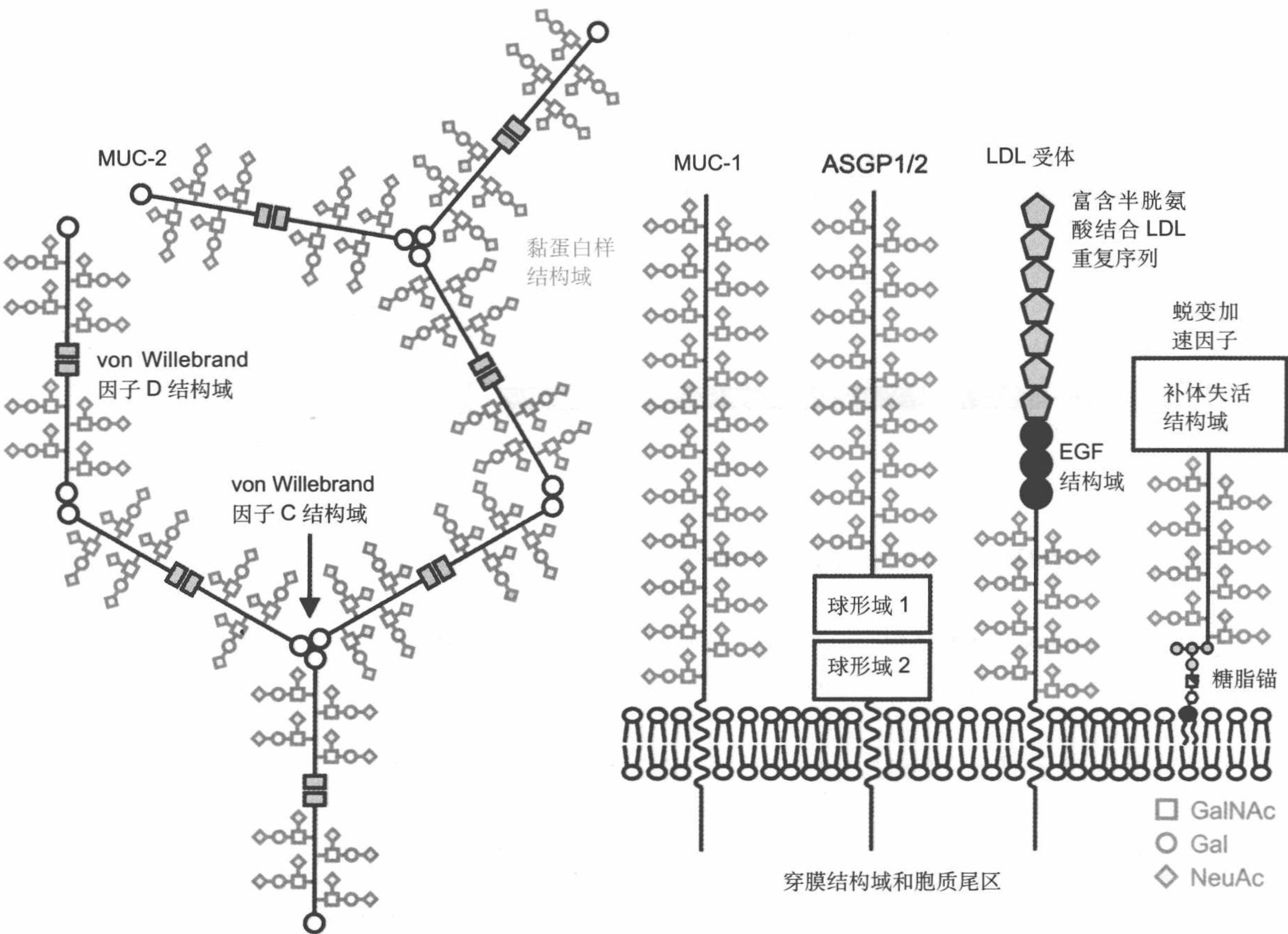


图 3.3 分泌黏蛋白 MUC-2、膜黏蛋白 MUC-1、ASGP（腹水唾液糖蛋白或大鼠 MUC-4）和其他含有黏蛋白样域的膜蛋白的对比。以串联重复序列中 O- 连接糖基化残基的延伸段作为鉴定“真正黏蛋白”的特征。比现在图上更多的聚糖也都可以与黏蛋白样域结合（图 3.2）。LDL. 低密度脂蛋白；EGF. 表皮生长因子

C 端的配体结合结构域，通过含有多个潜在 O- 连接糖基化位点的黏蛋白样结构域与膜连接。以二唾液酸化的核心结构 1 全面彻底地糖基化这类黏蛋白样结构域，通过庞大和荷电聚糖与保持在延伸构象中的多肽形成一种相对刚性的柄状物。蜕变加速因子（decay-accelerating factor）是蛋白质中的球形结构域通过一延长的黏蛋白样结构域和一糖脂锚与膜连接的实际例子。

有关糖脂锚参见 4.6 节。

由于蛋白质受体与 O- 连接糖结构的专一性相互作用，细胞表面黏蛋白可介导细胞黏附作用。多数这类相互作用是由独特的末端精细结构与核心 2（core 2）结构上多乳糖胺端结合产生的结果（图 3.1）。核心 2 结构是通过连接蛋白质的 GalNAc 与 β1-6 连接的 *N*- 乙酰葡糖胺（GlcNAc）残

基衍生化而形成的。和在 N- 连接聚糖中一样，可以按核心 2 与单一乳糖胺单位或多乳糖胺链结合的形式进行延伸。通常是由唾液酸与核心 2 结构的分支结合，并起到加帽作用，因为唾液酸的存在可以防止在多乳糖胺链上进一步添加乳糖胺单位。对 O- 连接聚糖上细胞黏附表位了解最清楚的例子是选凝素细胞黏附分子（selectin cell adhesion molecule）的配体。这些配体都是膜黏蛋白，其中大部分 O- 连接糖都是从细胞表面多肽延伸的单纯核心 1 结构。位于离膜最远处，靠近多肽末端只有一个结合位点，载有一个作为黏附事件末端加帽结构的核心 2 延伸结构。这种组织形式表明 O- 连接聚糖具有赋予多肽链物理性质及呈献专一性识别标签的双重作用。

更多有关选凝素参见 9.5 节和 9.6 节。

血型糖蛋白 A（glycophorin A）是第一个被确认的细胞表面高度 O- 连接糖基化的蛋白质。人类红细胞血型糖蛋白 A 中的糖和蛋白质结合，形成抗体识别部位。MN 血型系统反应活性的不同取决于胞外血型糖蛋白 A 的 N 端的氨基酸序列，但是与抗 M 或抗 N 抗体的反应则需要唾液酸与邻近丝氨酸和苏氨酸残基上的 O- 连接聚糖结合。

3.3 多数可溶性和细胞表面糖蛋白含有小簇的 O- 连接糖

个别糖基化的丝氨酸及苏氨酸残基和黏蛋白型小簇 O- 连接聚糖常在可溶性糖蛋白和细胞表面糖蛋白中出现。其糖基化的部位特征性地定位于多域蛋白质折叠球形域间的铰链或接头区。例如，IgA（图 3.4），其糖基化部位处于重链 Fab 和 Fc 部分之间的铰链区，而巨噬细胞甘露糖受体的糖基化部位，则位于几个分隔开的球形糖识别域的接头区。位于接头区 O- 连接糖的确切功能还很难断定，但是，这些 O- 连接糖很可能使原本柔性的肽段变为刚性。这些糖还可能对那些假如没有糖的覆盖就会极易被消化的肽段提供抗拒蛋白酶的能力。

更多关于甘露糖受体参见 9.4 节、10.8 节和 10.9 节。

3.4 黏蛋白型糖的生物合成是向高尔基体内的蛋白质上顺序添加单糖

在生物合成途径中，O- 连接糖基化装置利用了可与 N- 连接糖基化相

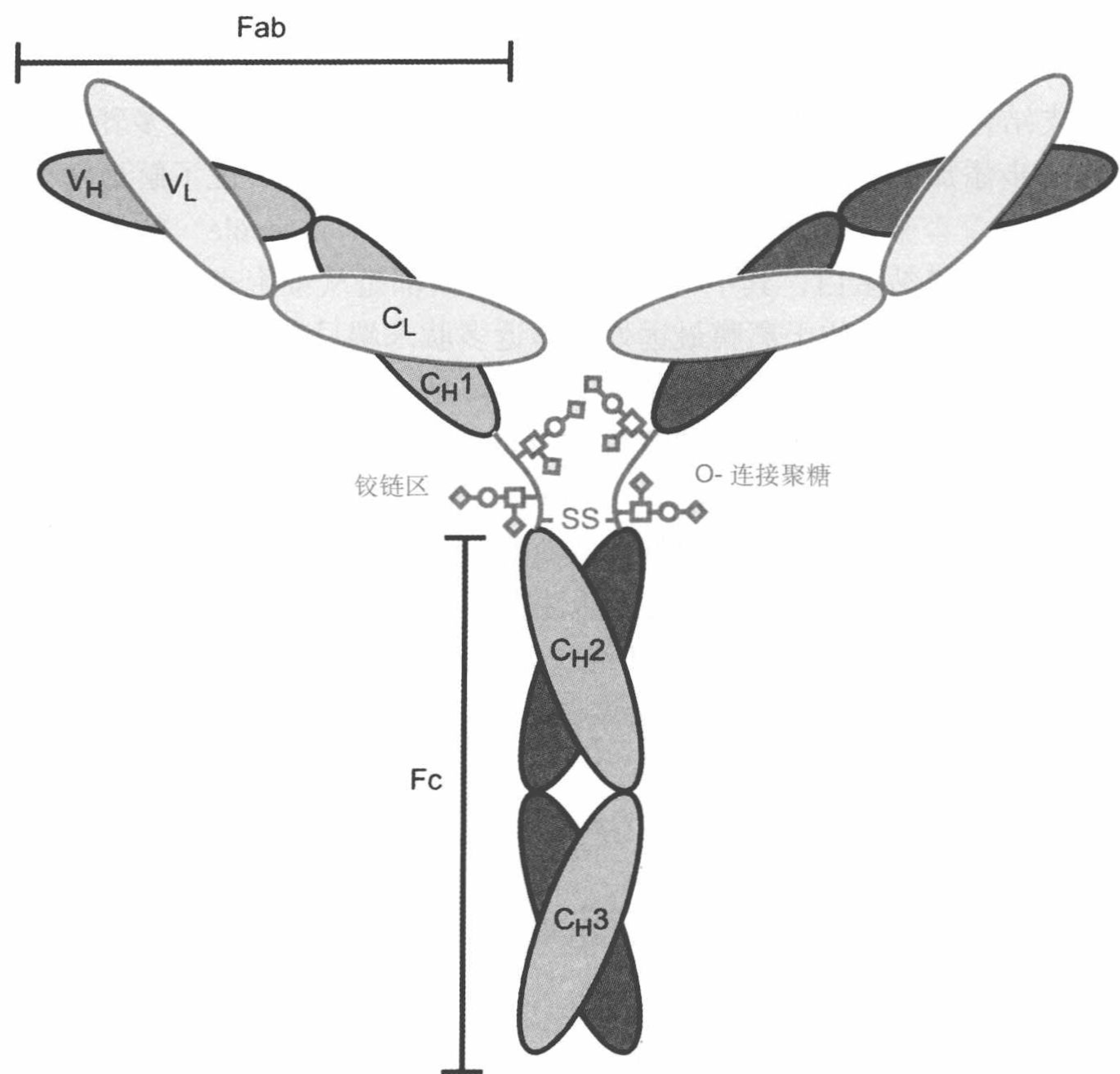


图 3.4 IgA 铰链区的小簇 O- 连接聚糖。各铰链中的 5 个聚糖结合位点，有助于确定铰链构象和提供抗拒蛋白酶的能力

类比的糖基转移酶，但这些酶的配置有实质性区别。O- 连接核心结构的添加过程在两个重要方面与 N- 连接核心的添加不同。首先，在系列反应步骤中，从添加第一个 GalNAc 残基开始，都是按顺序逐个与丝氨酸或苏氨酸连接，不是预先形成核心结构再整体迁移。其次，O- 连接糖基化不存在像界定 N- 连接糖基化位点一样的 Asn-X-Ser/Thr 单一靶序列。

O- 连接糖基化没有共同的靶序列，原因有多种。所有 N- 连接核心结构的糖基化都由单一的寡糖基转移酶催化，然而许多转移酶都可以使 GalNAc 与丝氨酸和苏氨酸残基连接。这些酶对糖基化靶标周围不同氨基酸序列的特异性也有不同，因此考查糖基化位点总库并不能指证是哪一个酶的特异性。当个别酶已被克隆和表达，这个酶就可以利用合成肽与潜在糖基化位点之间的不同氨基酸来判断这个家族个别成员的特异性。虽然这种研究方法并不能揭示决定糖基化的氨基酸的独特格局，但这些规则可以

用来分辨个别的酶。靶标糖基化位点趋向于出现在脯氨酸和丙氨酸以及丝氨酸和苏氨酸富集区。有些糖基转移酶的 R- 型凝集素结构域与邻近的 O- 连接糖结合，将酶的催化结构域引导到邻近的丝氨酸残基和苏氨酸残基上发挥作用。需要以先前已经存在的糖基化位点为工作起点的酶具有累进性，即继续延伸由另一转移酶启动的糖基化区，并由此形成像在黏蛋白中出现的糖基化氨基酸簇。

更多有关 R- 型凝集素结构域参见 11.6 节。

与 N- 连接核心在内质网内与蛋白质合成同时或稍后进行添加不同，核心 GalNAc 残基对丝氨酸和苏氨酸的添加是在高尔基体内翻译后进行的。对 O- 连接结构添加新糖的糖基转移酶遍布于高尔基体，与形成 N- 连接结构精细末端的酶非常类似。这种转移酶在胞内的分布，以及所有 O- 连接聚糖的糖部分都由核苷酸糖供体的单糖添加，为 N- 连接糖的末端修饰提供了一种颇具相似联系的例子。这种相互比较说明 O- 连接结构与直接缀合蛋白质的 N- 连接糖末端部分有些类似。

更多有关高尔基体内糖基转移酶参见 5.6 节。

3.5　蛋白聚糖是赋予胞外基质强度的高度 O- 连接糖基化蛋白质

蛋白聚糖（proteoglycan）是高度 O- 连接糖基化的重要蛋白质。蛋白聚糖与黏蛋白一样与水结合，但蛋白聚糖主要起结构性作用，不起润滑剂的作用。另外，黏蛋白的每个 O- 连接聚糖的体积都比较小，通常只由几个糖残基组成，与蛋白聚糖结合的聚糖都很大，含有多达 100 个糖残基。在这些聚糖中，单糖单位排列成由氨基糖和己糖衍生物残基交替组成的线形链（图 3.5）。因此，可以用下面的重复二糖单位来表述这些结构。这些糖胺聚糖（glycosaminoglycan）的名称表明分离它们的原始组织。例如，透明质酸（hyaluronic acid）、硫酸软骨素（chondroitin sulphate）、硫酸皮肤素（dermatan sulphate）和硫酸角质素（keratan sulphate）说明它们分别是从玻璃膜、软骨和皮肤中分离获得的。

蛋白聚糖分为两大类：一类出现在胞外基质，另一类定位于质膜。膜蛋白聚糖将在第 12 章中详细讨论。在结构性组织中，特别是在软骨组织中发现的蛋白聚糖是了解得最清楚的基质蛋白聚糖。软骨胶原纤维为有关组织提供刚性（抗弯曲）和强度（抗拉力），而蛋白聚糖则提供压力下抗压缩的复原力，这种功能高度取决于超分子复合体。主要的软骨蛋白聚糖的蛋白质核心聚集蛋白聚糖（aggrecan），沿多肽链按一定分隔距离编组结

糖胺聚糖	A 单位	B 单位	蛋白质核心	连键	组织
透明质酸	GlcA	GlcNAc	否	无	结缔组织 皮肤 软骨 滑液
硫酸软骨素	GlcA	GalNAc	是	*O*- 木糖	软骨 角膜 骨骼 皮肤 动脉
硫酸皮肤素	GlcA/IdoA	GalNAc	是	*O*- 木糖	皮肤 血管 心脏瓣膜
硫酸乙酰肝素	GlcA/IdoA	GlcNAc	是	*O*- 木糖	肺 动脉 细胞表面
硫酸角质素	Gal	GlcNAc	是	*N*-GlcNAc	软骨 角膜

图 3.5 糖胺聚糖结构和典型的表达部位。衍生自多乳糖胺重复单位的硫酸角质素，在典型的 N- 连接核心结构上从简单成分合成为复杂结构。其他结合蛋白的糖胺聚糖，通过一特定连键区，附着于丝氨酸残基上

合的糖胺聚糖（图 3.6）。结合区含有核心缀合木糖残基的丝氨酸 - 甘氨酸序列。这一核心通过硫酸软骨素链再行延伸。另外，当硫酸角质素作为代表形式的硫酸化多乳糖胺延伸链时，硫酸角质素链精巧地与典型 N- 连接聚糖连接。由蛋白质和结合聚糖组成的共价单位的质量约达到 2.5×10^6 Da，其大小大约相当于一个核糖体。

聚集蛋白聚糖多肽链 O- 连接糖基化中心延伸部分的侧面为球形结构域。多肽链 N 端的两个被称为 G1 和 G2 的结构域，由连接蛋白质的同源重复模体与这一聚集蛋白聚糖末端缔合的小分子多肽组成。连接蛋白质和 G1 这两个模件，可将多个聚集蛋白聚糖多肽锚固在透明质酸链上，由此产生的聚集体相对分子质量可达 2.5×10^8。聚集蛋白聚糖 C 端 G3 结构域

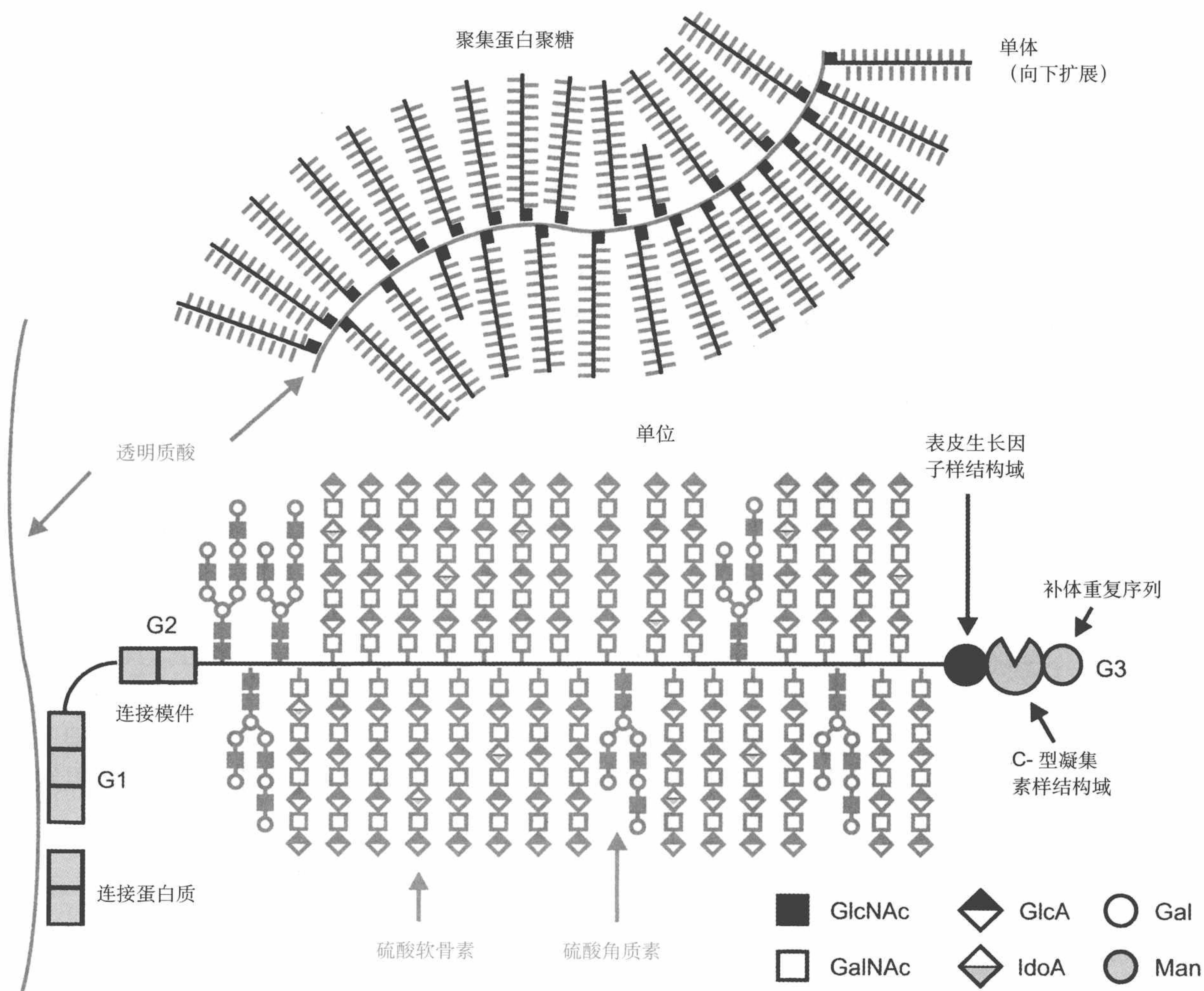


图 3.6　聚集蛋白聚糖多肽链组织结构和多肽键组装成大型聚集体。大约 100 个 O- 连接的硫酸软骨素链，每个链约含 100 个糖残基，30 个 N- 连接的硫酸角质素链，每个链约含 50 个糖残基，与核心多肽链结合。聚集体中，100 个和 200 个核心多肽之间缔合一个透明质酸分子

含有表皮生长因子样、补体控制型和 C- 型凝集素样结构域（C-type lectin-like domain）。这种 C- 型凝集素样结构域，能够和基质中的糖和蛋白质结合。G3 结构域出现在新合成的多肽上，但是这一结构域经常在组织老化时被蛋白酶解加工清除。结果表明，软骨组织中，核心多肽的这一部分可能具有过渡性的短期功能。

更多有关 C- 型凝集素结构域参见 9.1 节。

蛋白聚糖聚集体能使软骨产生复原力，是因为高度水合状态产生的效果。水的结合是由糖及由连接糖胺聚糖的大量硫酸残基介导。由于水合作用，聚集体占有非常大的体积，在压力下只能通过结合水的释放来减小体积，这是一种不利的热力学过程。这种聚集体被当做分子防震器或作为硬海绵体，在压力下缓慢地释放水，压力释放后，再将水收回。软骨在各关节和椎盘中有效地缓和由步行等活动所传导的对关节的震动和冲击。对比大鼠、人和牲畜不同物种中糖胺聚糖的结合区，发现大型动物的结合区比较长，这是因为编码聚集蛋白聚糖多肽部分的基因片段有所扩展。蛋白聚糖聚集体的增大，与大型动物关节负重增加有关。核心蛋白和糖基化这些核心蛋白质酶的突变可以证实软骨蛋白聚糖的重要作用。禽类中天生的短肢畸形突变导致缺失糖胺聚糖结合区和 C 端 G3 球形域截短的聚集蛋白聚糖核心蛋白质。这种突变蛋白不能支持长形骨骼的正常发育，造成严重的骨骼畸形。

蛋白聚糖除存在于软骨外，其他组织的胞外基质中也有发现。大脑中神经蛋白聚糖（neurocan）和血管、皮肤及其他一些组织中多功能蛋白聚糖（versican）的核心蛋白与聚集蛋白聚糖的核心蛋白非常相像。但是还另有一些可以和各种不同糖胺聚糖缀合的核心蛋白。其中一种含量最丰富的串珠蛋白聚糖（perlican）其核心蛋白是至少由 6 个球形域和只载有几个糖胺聚糖链组成的复杂模块蛋白。至今我们还未能详细了解不同核心蛋白的构造和特定糖胺聚糖的选配，是如何为满足个别组织特殊要求，提供所需物理和结构性质的。

3.6 蛋白聚糖生物合成除需要糖基转移酶外还需要几种修饰用酶

结合糖胺聚糖链的靶序列，一般为丝氨酸 - 甘氨酸序列。但不是所有丝氨酸 - 甘氨酸序列都以这种方式衍生，因此，肯定在蛋白质结构中，另有界定结合位点的信号。由核心木糖基转移酶（xylosyltransferase）的加工活性产生簇形链的添加，转移酶中邻近的丝氨酸 - 甘氨酸序列就成为糖基化初始序列之后酶的靶标。对木糖添加而言，虽然没有共同的序列，在丝氨酸 - 甘氨酸序列一侧成簇的负电荷常指导酶的起始作用。因为多数物种，只有一种木糖基转移酶，因此，启动和递进作用都由同一种酶承担。

蛋白聚糖与黏蛋白型聚糖的组装一样，都是逐步和有序地添加单糖。当共同的三糖核心结构组成之后，在不同蛋白聚糖核心蛋白上结合不同糖胺聚糖可能说明，或者至少部分地说明不同组织中的转移酶，其表达模式也有不同。另外，用合成受体底物的实验表明，侧翼氨基酸的模式也可能影响合成链的型式。但是，还有待于建立解码这一信息的规则。

通过氨基糖和糖酸残基序列交替添加，还可以使糖胺聚糖链再延长。合成肝素的葡糖醛酸和 GlcNAc 转移酶，在反应进行中增长延伸链，形成复合体。在其他类型糖胺聚糖合成中，也可能有相似的复合体参与。还不清楚是什么因素决定糖胺聚糖最终体积的大小。与 N- 连接和黏蛋白型 O- 连接寡糖的多聚乳糖胺链不同，在糖胺聚糖链延长中，没有发现竞争性的加帽反应。在启动重复结构和延长链两种酶之间的平衡对链的长度具有决定性影响。在高尔基体内适当区室中复合体的总体滞留时间及高尔基体膜囊的大小可能是链大小的其他限制因素。

多数蛋白聚糖的最终结构取决于糖胺聚糖原始合成链一系列有序的修饰作用，这类修饰反应可构建能够被生长因子和纤连蛋白结合的序列。这一反应是一种没有样板的反应过程，其中每一步反应都是分别进行的，虽然大多数修饰遵循严格的秩序（图 3.7）。硫酸乙酰肝素生物合成过程中的第一步是 *N*- 脱乙酰反应，随后是 *N*- 硫酸化反应。因为在这两反应步骤中酶的活性存在于同一多肽链中，它们彼此相互联系。在 *N*- 硫酸化反应之后，葡萄糖醛酸残基 5- 差向异构化为艾杜糖醛酸残基。最后一步反应是另一硫酸基转移酶，使硫酸基与 *N*- 硫酸化 GlcNAc 的 6 位和艾杜糖醛酸残基的 2 位结合。最初的 *N*- 脱乙酰反应为随后的硫酸化反应规定了反应型式。对已修饰底物的后续加工酶的要求，阐明了被称为簇聚型结合位点的这些 S- 结构域是如何在糖胺聚糖中形成的。

➲有关更多蛋白聚糖和生长因子参见 **12.1~12.3** 节。

总之，糖基化蛋白聚糖分子完整的生物合成，可能包括千万个单个反应。最终的详细结构是不均一性的，但含有蛋白聚糖功能所需的可复制的结构元素。具有适当密度的现存关键结构，是由糖基转移酶和其他一些需要专一性肽和糖序列作用的酶所主导的添加和修饰联合作用产生的结果。

3.7 出现在蛋白质上的异型 O- 连接糖基化

异型 O- 连接糖基化多数产生于锚固在核心结构的不同末端精细结构，特别是结合在黏蛋白核心 2 的结构上。但是，氨基酸侧链的羟基与糖之间另有几种连键。除 GalNAc 和岩藻糖之外，甘露糖有时也与细胞表面和分

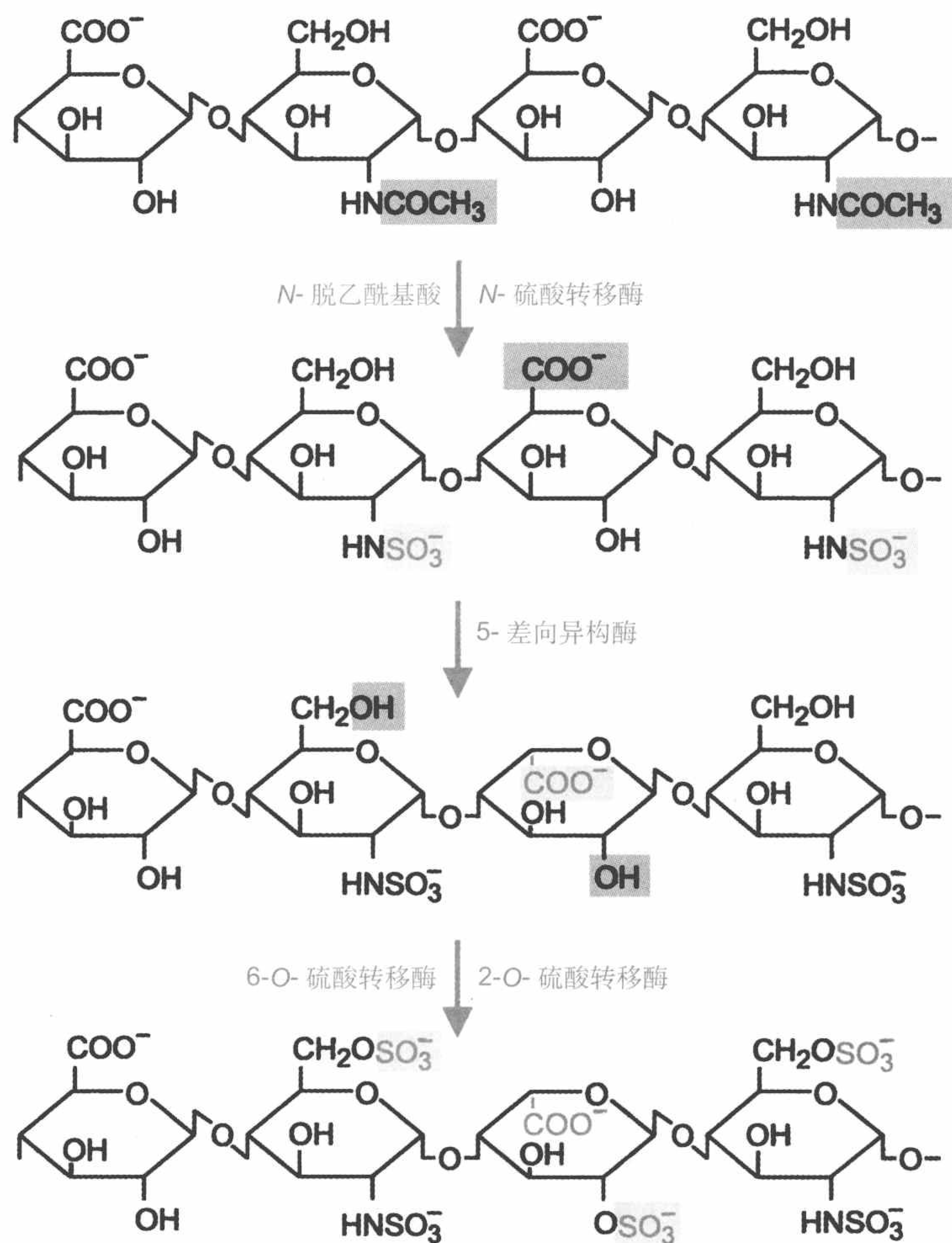


图 3.7 硫酸乙酰肝素的生物合成。合成需要进行主链重复结构的组装和用 *N*- 硫酸基团置换 *N*- 乙酰基团。由双功能酶介导这一合成过程。葡糖醛酸残基选择性地差向异构化为艾杜酸的反应发生之后，按顺序发生 GlcNAc 残基 6-*O*- 硫酸化和艾杜酸残基 2-*O*- 硫酸化。在硫酸乙酰肝素延伸链内部，选择性地修饰某些区域，产生像图显示的一种序列，这一序列能够高亲和力地结合成纤维细胞生长因子

泌蛋白中的丝氨酸和苏氨酸残基结合。还有几个例子是糖与酪氨酸残基的羟基结合。例如，出现在糖原核心区的葡糖基酪氨酸连键，可以作为糖原分支结构的增长锚。

一种最丰富的 O- 连接糖基化类型，常在载有胶原样三螺旋域的胶原和蛋白质中出现。在这些域内，出现在 Gly-X-Y 三联体 Y 位的赖氨酸残基通常由赖氨酸羟化酶修饰，形成 4- 羟化赖氨酸（图 3.8）。多数 4- 羟化赖

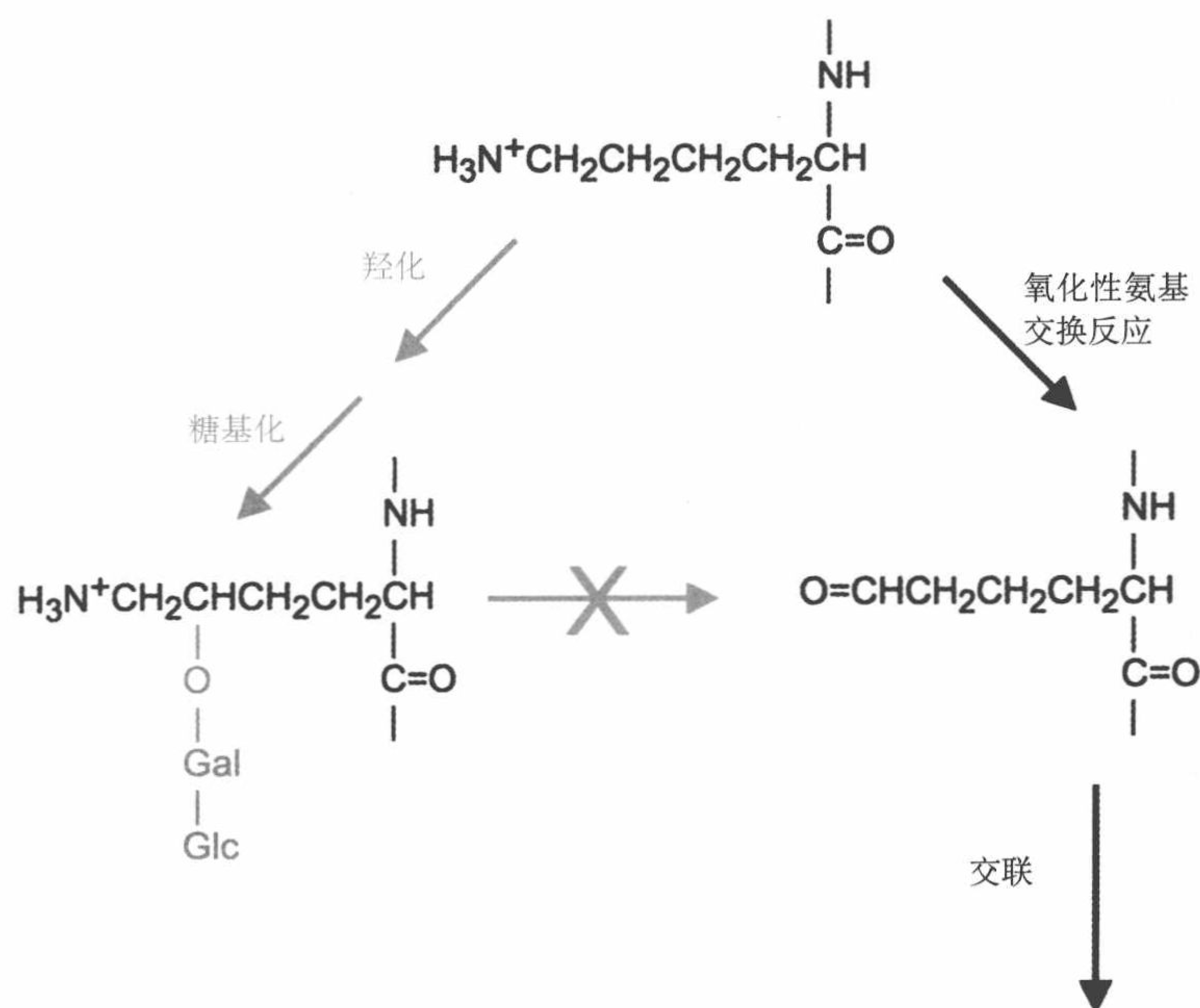


图 3.8 胶原中赖氨酸残基的另一修饰作用。于羟化赖氨酸残基上添加二糖可防止胶原分子间形成交联

氨酸残基与 Glcα1-2Galβ 二糖缀合。赖氨酸羟化和随后的糖基化的抑制作用，似乎对三螺旋的形成没有影响，但确实影响了由三螺旋域集结成束而形成的纤维交联，结果可能是直接影响了糖在纤维内包装布置的作用，另外，也可能反映出在赖氨酸侧链的羟化和糖基化两种修饰作用之间存在竞争，因为两种作用都互相排斥形成醛基的氧化作用，而醛基通过与赖氨酸残基形成希夫碱造成纤维交联。

3.8 通过添加 O- 连接 *N*- 乙酰葡糖胺修饰胞质和核内蛋白

虽然糖基化的蛋白质常出现在胞质外的区室，但 *O*-GlcNAc 则常在胞质和细胞核内出现。一种可溶性 GlcNAc 转移酶可以催化 β1 连键中 GlcNAc 与丝氨酸和苏氨酸残基的结合。除在细胞内不寻常的定位外，*O*-GlcNAc 在糖基化中的可逆反应也是很独特的。一种清除可溶性 *N*- 乙酰

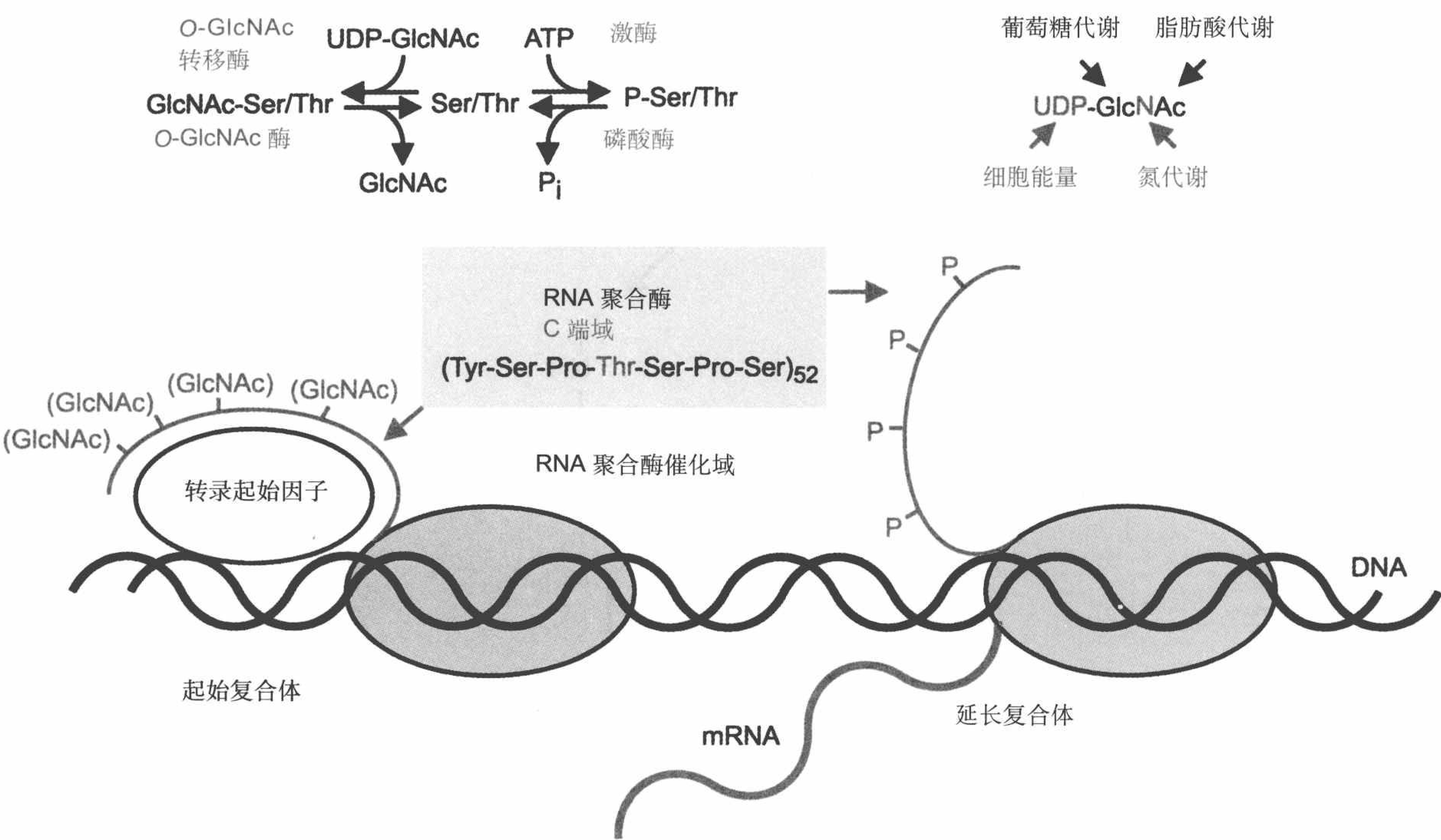


图 3.9 以 GlcNAc 或磷酸基团修饰丝氨酸和苏氨酸残基。激酶和磷酸酶可以交互地添加或清除 GlcNAc 的酶。UDP-GlcNAc 部分可以应答细胞多方面的代谢。RNA 聚合酶 C 端延伸结构域的磷酸化，导致转录起始因子分解，转化为延长复合体。ATP. 腺苷三磷酸；UDP. 尿苷二磷酸。部分摘自 Wells, L., Vosseller, K. and Hart, G.W. (2003). A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance, *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 222-228.

葡糖胺酶清除的 GlcNAc 可以被转移酶置换（图 3.9）。因此，任何一种特定丝氨酸或苏氨酸残基的 GlcNAc 修饰都反映了转移酶和糖苷酶作用之间的动态平衡。

作为 *O*-GlcNAc 修饰靶标的蛋白质可以列出很长的名单，而且不断地在增加。最初鉴定的这些靶标都与细胞核和核孔复合体相关，包括许多转录因子。但实际上，目前载有 *O*-GlcNAc 蛋白质的例子，包括了各类暴露给胞质的蛋白质，包括细胞骨架、质膜和可溶性蛋白质。在所有真核生物细胞，包括在单细胞生物酵母中，都鉴定出 *O*-GlcNAc。

O-GlcNAc 修饰作用的动态和广泛分布的特性，让人联想到胞内蛋白质的磷酸化反应。许多磷酸化蛋白质也可以由 *O*-GlcNAc 修饰。*O*-GlcNAc

添加作用的靶序列性质表明，这一修饰作用的专一性与蛋白质激酶的专一性类似。虽然没有单纯作为 GlcNAc 转移酶靶标的共有序列，以天然修饰蛋白质与合成肽底物进行对比，除在靶序列中发现丝氨酸和苏氨酸外，还发现了对脯氨酸和丙氨酸残基的偏好。有趣的是这种分布方式实际上与 GalNAc 添加到胞外糖蛋白周围位点的分布方式有些类似。与蛋白激酶和磷酸酶这些大家族不同，在一给定有机体中似乎只有一种胞质 GlcNAc 转移酶和 *N*- 乙酰葡糖胺酶。

具有两种可能修饰的单一靶氨基酸，可能另有控制标准。例如，特异位点的磷酸化需要 *N*- 乙酰葡糖胺酶和激酶两种酶的活性。在特定的蛋白质上建立 *O*-GlcNAc 水平或者建立 GlcNAc 转移酶和 *N*- 乙酰葡糖胺酶活性与任何信号传送机制的联系都有困难。其中在这方面最令人关注的例子是 RNA 聚合酶 II 的 C 端延伸结构域，一种转录信使 RNA 分子的酶（图 3.9）。这种由 52 个七氨基酸序列复本组成的末端延伸结构域是 GlcNAc 转移酶和蛋白质激酶的靶标。未磷酸化形式的末端结构域与转录起始复合体中的转录因子相互作用，而磷酸化反应导致酶从这些因子中释放并转化为延长复合体。因此，可以顺理成章地令人相信末端结构域的 *O*-GlcNAc 可以调控磷酸化作用，并且从起始形式的酶转化为延长形式。

3.9　O- 连接 *N*- 乙酰葡糖胺是代谢传感器系统的组成部分，对糖尿病有影响

在有些细胞中，至少有一部分结合蛋白质的 *O*-GlcNAc 水平是由葡萄糖浓度调制。葡萄糖浓度与 *O*-GlcNAc 添加之间的连接物为 UDP-GlcNAc，是被 *O*-GlcNAc 转移酶利用的活化糖供体。UDP-GlcNAc 通过已糖胺生物合成途径合成。在此途径中，衍生自葡萄糖的果糖 6- 磷酸首先通过从谷氨酰胺转移酰胺基，然后再通过谷氨酰胺：果糖 6- 磷酸酰胺基转移酶催化的差向异构化反应转化为葡糖胺 6- 磷酸。葡糖胺 6- 磷酸经过一系列步骤转化为 UDP-GlcNAc 用于糖基化反应。*O*-GlcNAc 转移酶活性对 UDP-GlcNAc 浓度变化特别敏感，使得 *O*-GlcNAc 添加对葡萄糖浓度变化也非常敏感。这一生物合成途径同样可以应答细胞的其他代谢方式（图 3.9）。

通过已糖胺生物合成途径中葡萄糖在敏感组织中流通量的增加，已被证实与导致 II 型糖尿病胰岛素抗药性发展相关联。这一途径可以充当细胞

营养状况和调节胰岛素活性的传感器，包括发现在小鼠骨骼肌、胰脏 β- 细胞和脂肪组织中谷氨酰胺：果糖 6- 磷酸酰胺基转移酶的超表达导致胰岛素抵抗。两种酶中每一种酶的超表达都导致 *O*-GlcNAc 对蛋白质修饰的增加，很可能这就是造成 II 型糖尿病胰岛素抗药性的基本机理。许多参与胰岛素信号传送途径的蛋白质，包括胰岛素受体底物 1（IRS-1），都经过 *O*-GlcNAc 修饰，但这一修饰作用是否影响活性还不清楚。

糖原合酶，这种负责葡萄糖应答胰岛素刺激合成糖原的活性受添加 *O*-GlcNAc 的影响。在高水平葡萄糖存在下，对糖原合酶添加更多的 *O*-GlcNAc，就会降低胰岛素引发的蛋白质磷酸酶 1 对糖元含酶激活作用的灵敏度。因此，糖原合酶 *O*-GlcNAc 修饰的增加，可能是胰岛素抗药性机制的原因之一。除与糖尿病发病有关之外，胞外葡萄糖浓度与胞内蛋白质 *O*-GlcNAc 修饰之间的联系，可能是细胞对营养物供给的一般性应答部分。对参与信号传送途径的转录因子或蛋白质的 *O*-GlcNAc 添加，可以调制细胞对环境的应答。另外，由 *O*-GlcNAc 对蛋白酶体的修饰可以抑制蛋白质的降解，为蛋白质与氨基酸供给和细胞的营养状况之间建立了一种关联机制。

缺乏 GlcNAc 转移酶的细胞不能生存，表明 *O*-GlcNAc 的修饰作用在细胞生理学上具有重要作用。引入细胞的半乳糖基转移酶形成半乳糖残基对 *O*-GlcNAc 的修饰反应，可以防止其通过 *N*- 乙酰葡糖胺酶释放。这些细胞在一细胞周期内凋亡，确定 *O*-GlcNAc 至少有一项重要作用，可以控制细胞周期。因此，至今有证据证明，*O*-GlcNAc 在控制细胞过程中起着极为重要和独特的作用，但是，在我们了解 *O*-GlcNAc 功能机理时，还缺少有关的必要联系。

小　结

O- 连接聚糖在结构和功能两个方面最具多样性，其多样性的完全范围至今尚未明确建立。对 N- 连接聚糖而言，至少有一个共同蛋白质 - 聚糖连键并且相对地分成几种结构类型，说明在后期演变成共同的生物合成途径。与之相比，O- 连接聚糖基团建构于不同的蛋白质 - 聚糖连键，其中 GalNAc、岩藻糖、GlcNAc、甘露糖、木糖或者半乳糖都可与丝氨酸、苏氨酸或羟化赖氨酸残基结合。有些 O- 连接聚糖上的末端结构类似于或者等同于 N- 连接聚糖上的结构，说明这两类糖基化反应的功能可能相互重叠。事实上，参与合成这些结构的酶可能是共同的，表明这些共有的酶经过共同进化，展现相同的可以参与各种识别事件的末端精细结构。但是 O- 连接聚糖自身已进化到行使独特的功能，关于这方

面的许多情况，有待于继续探究、开拓。

主要参考文献

Butkinaree, C., Park, K., and Hart, G. W.(2010), O-linked β-*N*-acetylgtucosamine(*O*-GlcNAc): Extensive crosstatk with phosphorylation to regulate signalling and transcription in response to nutrients and stress, *Biochimica et Biophysica Acta* **1800**, 96-106. 本文作为该期刊整期专题的一部分，建议性地总结了 *O*-GlcNAc 的修饰功能。

Esko, J. D. and Selleck, S. B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate, *Annual Review of Biochemistry* **71**, 435-471. 详细评论了硫酸乙酰肝素的生物学和生物化学。

Hanisch, F. -G., Reis, C. A., Clausen, H., and Paulsen, H. (2001). Evidence for glycosylation-dependent activities of potypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and-T4 on mucin glycopeptides, *Glycobiology* **11**, 731-740. 通过 GalNAc- 转移酶证明对 O- 连接糖基化特异底物要求的实验。

Heikkinen, J., Risteli, M., Wang, C., Latvala, J., Rossi, M., Valtavaara, M., and Myllyla, R. (2000). Lysyl hydroxylase 3 is a muttifunctionat protein possessing collagen glucosyltransferase activity, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36158-36163. 胶原中黏蛋白表达和结构变化的论文。

Kim, Y. S., Gum, J., Jr., and Brockhausen, I. (1996). Mucin glycoproteins in neoplasia, *Glycoconjugate Journal* **13**, 693-707. 癌症中黏蛋白表达和结构变化的论文。

Roman, J., Fritz, T. A., Gerken, T. A., Jamison, O., Live, D., Liu, M., and Tabak, L. A. (2008). The catalytic and lectin domains of UDP-GalNAc: polypeptide α-*N*-acetylgalactosaminyltrans-ferase function in concert to direct glycosylation site selection, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22942-22951. 这篇论文总结了启始黏蛋白型糖基化多种酶之间的差异并提出靶向和催化结构域凝集素域的作用。

Thornton, D. J., Rousseau, K., and McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the poly-meric mucins in airway mucus, *Annual Review of Physiology* **70**, 459-486. 虽然此文的重点关于呼吸道黏蛋白，但对所有黏蛋白糖蛋白及其物理性质是一篇很好的评论性文章。

Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R. A., and Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 151-208. 评论不同类型 O- 连接聚糖的结构、生物合成和功能的论文。

Vertel, B.M. (1995). The ins and outs of aggrecan, *Trends in Cell Biology* **5**, 458-464.

评论聚集蛋白聚糖的生物学和生物化学。

Vestweber, D. and Blanks, J.E. (1999). Mechanisms that regulate the function of selectins and their ligands, *Physiological Reviews* **79**, 181-213. 详细评论了选凝素及其糖蛋白配体的结构和功能。

习 题

3.1 O- 连接聚糖和 N- 连接聚糖生物合成途径之间有哪些异同？

3.2 O- 连接聚糖的主要功能是什么？ O- 连接聚糖与 N- 连接聚糖有哪些共同的功能？

3.3 O- 连接 GlcNAc 蛋白质的修饰方式与其他类型的 O- 连接糖基化和 N- 连接糖基化有何不同？这种型式糖基化的哪些特殊性质可以修饰蛋白质信号传送系统的活动？

3.4 讨论采用 *O*-GlcNAc 酶的不同抑制剂，对 *O*-GlcNAc 作用相互矛盾的证据。
参考文献：Macauley, M.S., Bubb, A.K., Martinez-Fleites, C., Davies, G.J., and Vocadlo, D.J. (2008). Elevation of global *O*-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of *O*-GlcNAcase does not induce insulin resistance, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34687-34695.

3.5 为什么从蛋白质氨基酸序列中难以预测 O- 连接糖基化位点？对比已知含有 O- 连接糖基化位点的蛋白质序列，从中能够学到什么？
参考文献：Hema Thanka Christlet, T. and Veluraja, K. (2001). Database analysis of O-glycosylation sites in proteins, *Biophysical Journal* **80**, 952-960.

3.6 对比蛋白聚糖和黏蛋白在结构、生物合成和功能上的差别。

3.7 评价在蛋白质上添加 O- 连接岩藻糖不是发生在高尔基体内，而是发生在内质网的证据。
参考文献：Luo, Y. and Haltiwanger, R.S. (2005). O-fucosylation of notch occurs in the endoplasmic reticulum, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11289-11294.

糖脂和膜蛋白糖基化

4

学习目的

学习本章后应知内容：

1. 膜糖蛋白的糖基化型式
2. 各种糖脂结构
3. 糖脂分解缺陷的影响
4. 蛋白质上糖脂锚的结构及其在不同有机体中的功能

动物细胞表面富含糖缀合物。在质膜糖蛋白和糖脂上的聚糖形成一种突出细胞表面 100Å 的网状结构（图 4.1）。在薄切片电子显微镜下能观察到这种被称为糖萼的网状结构。糖萼是细胞最外层表面代表性的结构，并在细胞相互作用方面具有明确界定的作用。与连接在可溶性糖蛋白的聚糖一样，质膜中的一些聚糖也能在信息和结构方面起作用，本章将讨论这方面的问题。

4.1 膜整合蛋白质多为糖基化的蛋白质

在前面几章中，已讨论过膜蛋白的糖基化，然而膜糖蛋白的特异性共同特征值得格外关注。与细胞表面相关的水溶性蛋白质通常被认为是胞外基质的一部分，不属于质膜。质膜主要的糖蛋白都是膜整合蛋白。总之，结合这些蛋白质的 N- 连接聚糖和 O- 连接聚糖与出现在分泌蛋白上的聚糖相类似，而且合成和结合这种聚糖的机器与膜蛋白和分泌蛋白也一样。但是，像含有多乳糖胺延伸的某些结构，多见于膜蛋白。

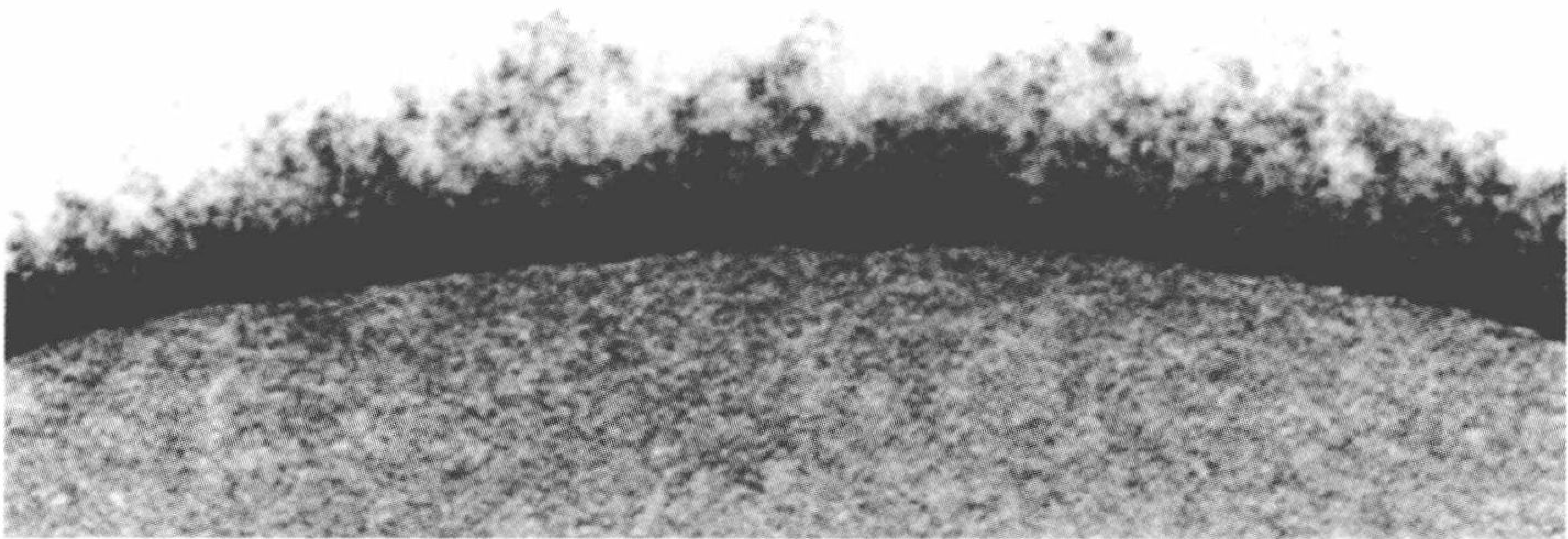


图 4.1 红细胞表面糖萼的电镜图像。经出版商允许，复制于 D.Voet 和 J.G.Voet 编著的《生物化学》（1995）。原件由加利福尼亚大学洛杉矶分校 Harrison Latta 提供

有关质膜表面糖基化位点的分布，无固定规律可循，但存在一些常见分布模式（图 4.2）。在仅有一个穿膜序列的膜蛋白中，最普遍的分布形式是 N- 连接糖基化位点位于离膜最近的多肽部分。特别是在寡聚膜蛋白的糖基化区域，在突出细胞表面结构域的茎状物周围可能形成特殊的领圈。这种寡糖环有助于保持蛋白质垂直定向于细胞膜表面。膜整合蛋白中的 O- 连接糖基化延伸区具有同样的作用。这些聚糖所处的位置，不在糖萼 (glycocalyx) 表面，相对而言，更接近细胞表面，不大可能成为识别事件的靶标。

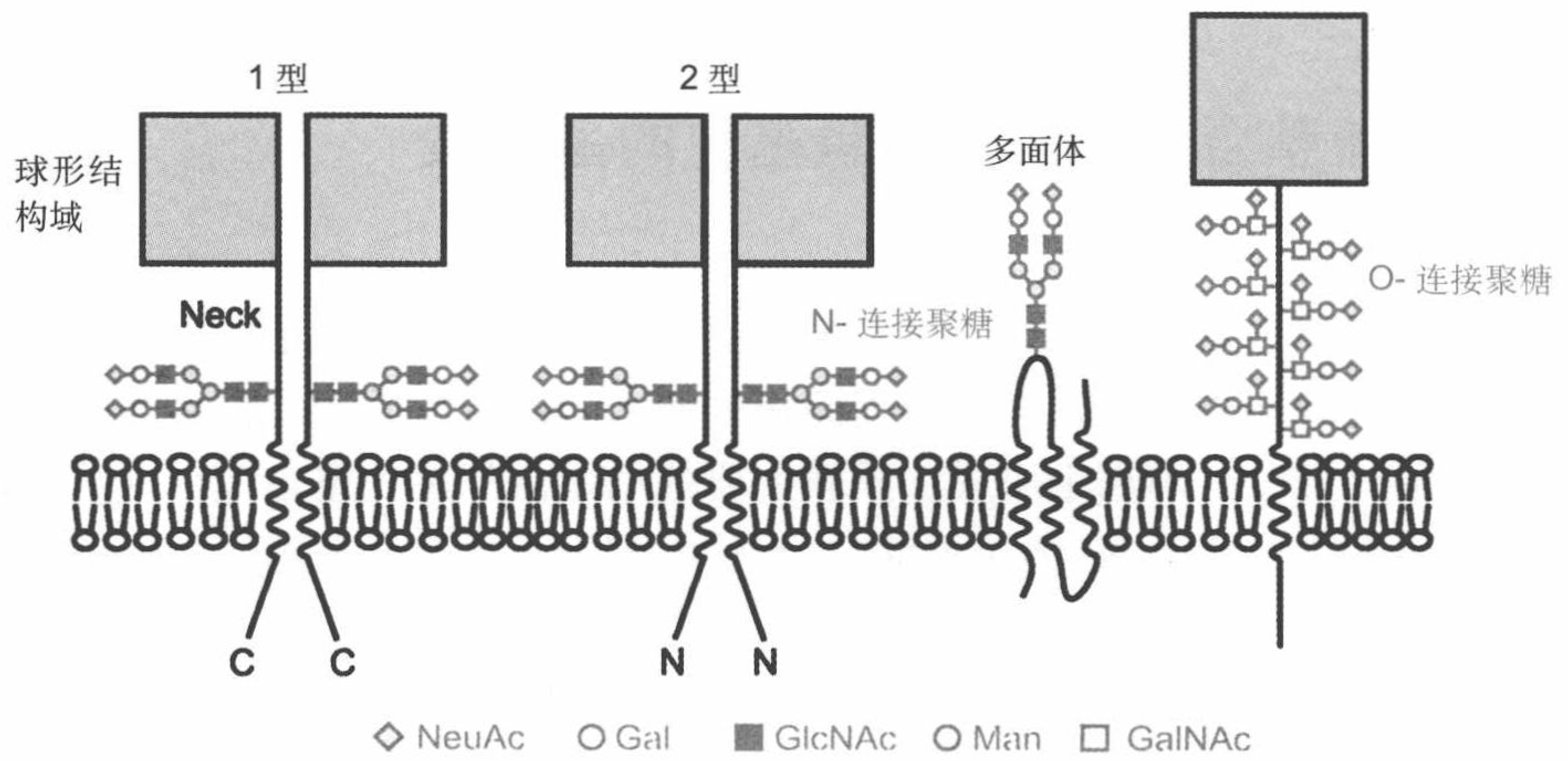


图 4.2 膜蛋白糖基化通用图式。单型穿膜蛋白含有按两种不同方向定位的单一穿膜序列、多型穿膜蛋白有多个不同排列方式的穿膜序列。多数膜蛋白都载有 N- 连接和 O-连接两种聚糖

含有多个穿膜节段的膜蛋白，也常常载有 N- 连接聚糖。通常来说，每一多肽链只有一个糖基化位点，而且这种情况多出现在含有 30 个或更多氨基酸的大环中。糖基化大多发生在蛋白质大小适当的胞外 N 端环内。每个多肽链只选取一个糖基化位点，表明这类蛋白质的膜域内密集着 α 螺旋，其外表面的暴露空间有限。因此糖在蛋白质上面形成了一种局部的保护伞。

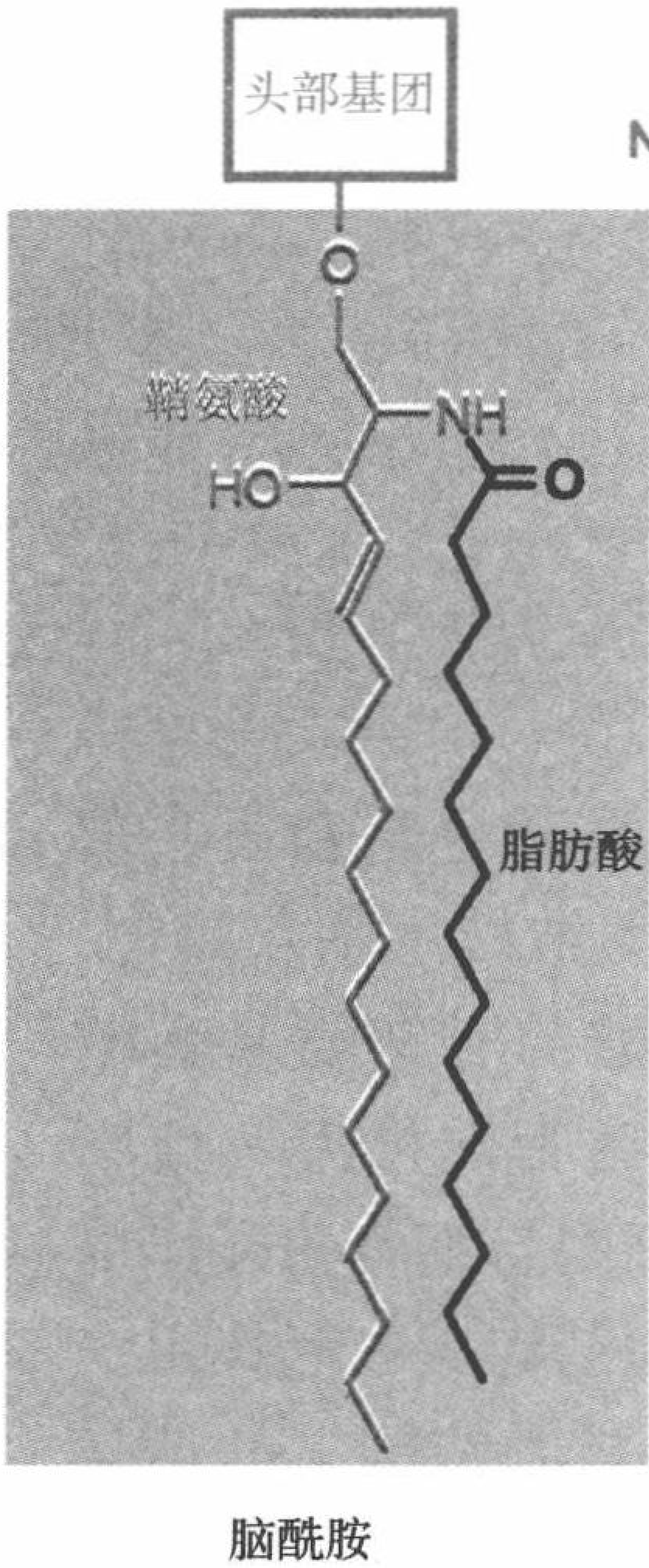
4.2 细胞膜含有糖脂和糖蛋白

聚糖除了与动物细胞表面出现的膜整合蛋白结合外，也与脂质头部基团连接。包埋在膜双层中糖脂的脂质部分分成两类结构（图 4.3）。由于脑酰胺（ceramide）的形成是通过酰胺键的脂肪酸与长链氨基醇鞘氨醇（sphingosine）连接，因此，建构于脑酰胺上的糖脂被称为鞘糖脂（glycosphingolipid）。鞘糖脂与膜糖蛋白同样具有向细胞与细胞相互作用参与者呈献潜在识别标志的作用。它们也在组织特定膜结构域中起作用。相比之下，建构于磷脂酰甘油（phosphotidylglycerol）核心结构上的糖基磷脂（glycophospholipid）则形成了一种将蛋白质锚定于细胞表面的反应机制。

鞘糖脂主要分成两个亚组，它们之间的区别在于结合的头一个糖残基是半乳糖还是葡萄糖。最初的半乳糖鞘脂（galactosphingolipid）是相对简单的硫苷酯（sulphatide）分子，其半乳糖是在 3 位上被硫酸化的。葡糖鞘脂（glucosphingolipid）的头部基团更为精密细致，通常类似于糖蛋白上的末端聚糖。

鞘糖脂的命名原则常令人困惑不解。“sphingo”这一名称是指希腊神话中斯芬克斯（sphinx）之谜，如此命名是要说明糖脂具有谜一样的未知功能，但这样命名，其用意无法解释清楚。多数脂质最初都是从脑中分离的，最常见的结构系列之一——神经节苷脂（ganglioside）的命名就根据这一事实。结构中只有一个与核心葡萄糖相连的半乳糖残基，一种最短的神经节系列成员被称为 G3，添加一个 *N*- 乙酰半乳糖胺（GalNAc）残基，形成 G2 的成员，再用一个半乳糖残基进一步延伸，则形成成员 G1。在缩略语中的 G 和数字之间插入的第二个字母表示核心唾液酸化的状态，如 M 表示单唾液酸化，D 表示二唾液酸化，T 为三唾液酸化等。添加下标字母是为了区别异构体中唾液酸不同的结合位置。

磷脂酸



脑酰胺

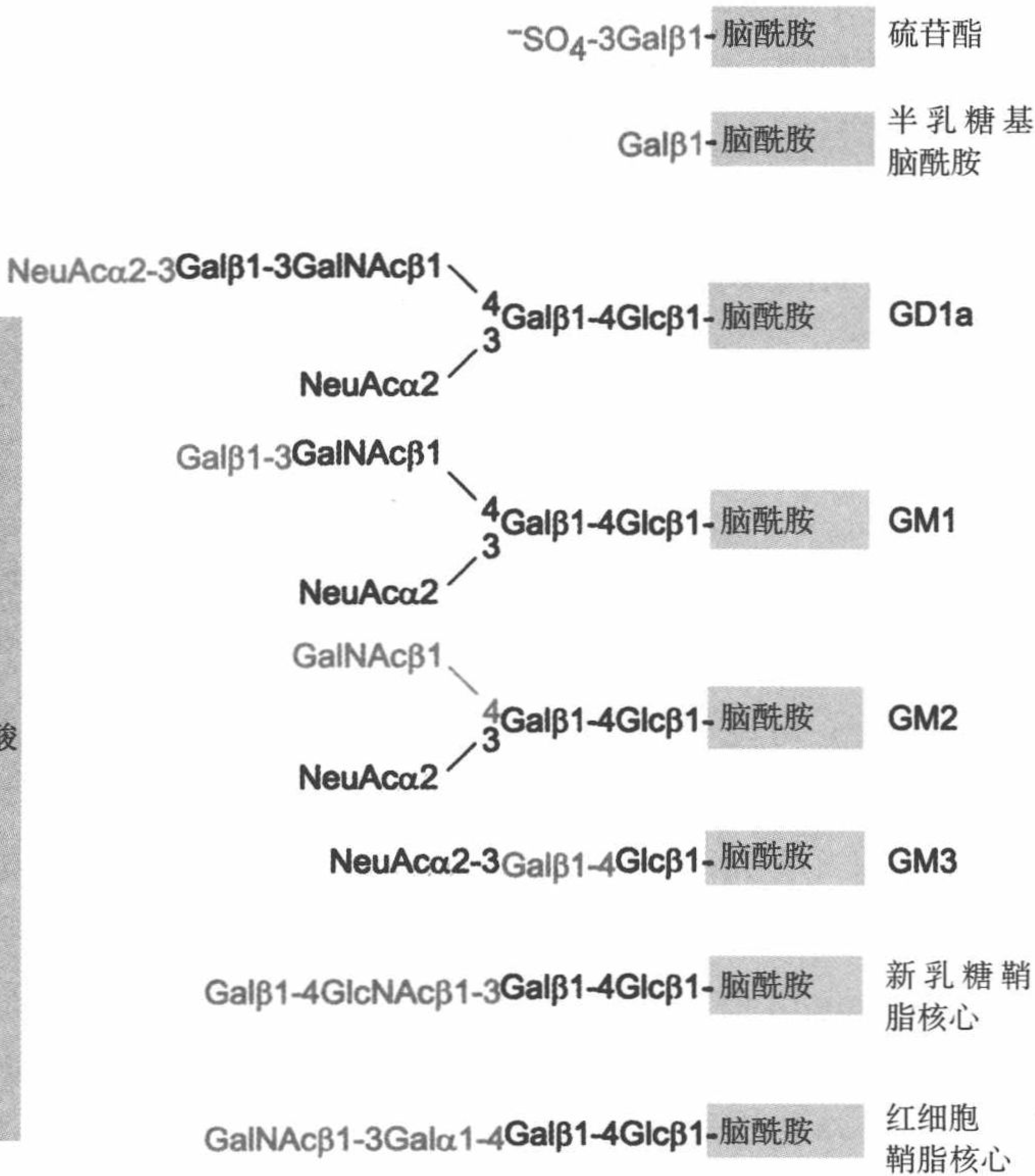


图 4.3 鞘糖脂和糖基磷脂脂质部分的共价结构和糖鞘脂头部基团的结构。葡糖鞘脂一般都比半乳糖鞘脂有更强的复合性，至少能在包括所示神经节［GM 和 GD］、新乳糖和球形系列在内的 6 种不同的主链结构上建构葡糖鞘脂

至少已经有了另外 7 种已知的核心序列。新乳糖苷（neolactoside）（新乳糖系列）的核心重复单位是结合糖蛋白 N- 连接聚糖和 O- 连接聚糖上多乳糖胺结构中熟悉的 Galβ1-4GlcNAc 二糖。这种结构和在其他糖脂和糖蛋白聚糖的核心与延伸区所见到的结构相似性，表明在这两种糖缀合物上都可以建构类似的精细末端。把精细末端的多样性与核心结构的多样性组合在一起，可以组成百余种不同的糖脂物种。

4.3 鞘糖脂生物合成发生在高尔基体内

鞘糖脂的生物合成类似于糖蛋白中转移至天冬酰胺残基的连接多萜醇

聚糖的生物合成。葡糖鞘酯的合成从内质网膜胞质表面核苷酸糖供体添加第一个葡糖残基开始启动（图 4.4）。脂质移动通过分泌途径后，经过尚未了解清楚的穿膜翻转过程，使脂质接近高尔基体内的核苷酸糖供体进一步添加糖。与其相比，半乳糖鞘脂生物合成的第一步是在膜腔内侧进行，为进一步添加糖而接近转移酶，不需要再进行翻转。参与糖脂生物合成第一阶段的糖基转移酶，决定特定类型细胞的核心结构系列。用酶添加某些末端结构与在糖蛋白 N- 连接和 O- 连接结构上创建精细末端有些类似。但多数情况下，都是由不同的酶修饰糖脂和糖蛋白的聚糖。糖脂通常是沿着膜蛋白的途径，经过细胞的腔内区室转移到质膜。

4.4　鞘糖脂能在质膜中形成不同的结构域

多数糖脂都组装成称作脂筏的分立的微结构域。糖脂一旦抵达质膜胆固醇与脂双层内的鞘脂相互作用导致脂筏持续存在。除糖脂外，鞘脂中还包括鞘磷脂，其中的磷酸胆碱头部基团取代了聚糖。虽然对脂筏形成的分子理论基础还不甚清楚，但据信脂筏与磷脂周围形成的流体相不

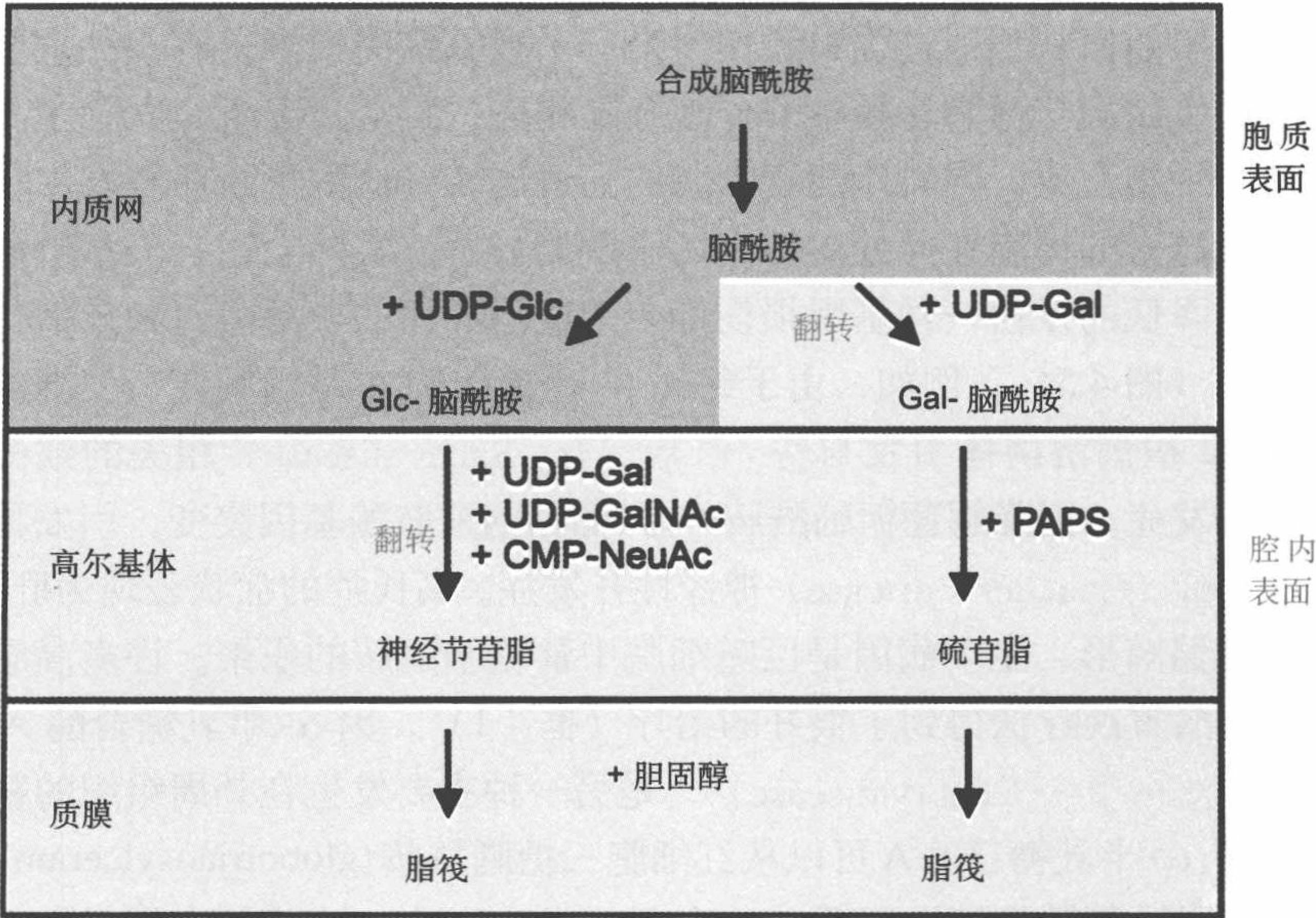


图 4.4　鞘糖脂生物合成途径示意图。半乳糖基和葡糖基鞘脂合成起始于膜的胞质一侧，完成于腔内，但是两者在途径中的穿膜翻转点不同。硫酸基的供体为 3′ - 磷酸腺苷 5′ - 磷酰硫酸 (PAPS)。 CMP. 胞苷一磷酸；UDP. 尿苷二磷酸

同，而是形成一种凝胶相。脂筏具有抗去污剂溶解的作用而同样条件下膜上的大量磷脂均被溶散流失。不同类型的脂筏，糖脂成分也有不同。例如，糖鞘脂 GM1 是大多数脂筏的共有成分，但与 GM1 相关的 GM3 分子，只在不与陷窝蛋白缔合的脂筏中出现。陷窝蛋白是质膜中的内在蛋白质，出现在质膜表面称之为胞膜小窝烧瓶样内陷，参与像特化胞吞形式的膜转运事件。

糖脂对专一性膜受体的性状具有调节作用，至少可以通过其活性，部分地影响受体的定位。例如，胰岛素受体（insulin receptor）分隔成富含神经节苷脂 GM3 的膜区，从启动胞内信号传送底物与胞膜小窝相互作用处可以清除受体。GM3 也可以调节表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor）的活性。在这种情况下，糖脂聚糖的头部基团可与受体上的 N- 连接聚糖直接作用，通过防止受体二聚化抑制受体激活。

4.5 糖脂分解缺陷引发疾病

糖生物学与疾病**糖脂贮积病**

更多关于细菌毒素参见 11.6 节。

对于糖脂生理学方面的作用我们了解的不多，与之相比，对糖脂分子参与的一些病理学过程了解的比较清楚。糖脂作为细菌毒素受体的功能，对了解糖脂如何在识别过程中起作用是一个很不错的模型。有一种重要的家族性遗传疾病与糖脂途径中的分解缺陷相关。正常情况下，大脑中高水平的糖脂生物合成，同时伴随着糖脂的高速周转，这种更新周转发生在溶酶体，输送来的糖脂在此处由特定的水解酶分解。实际上，丧失水解酶或使酶活性降低的任何一种基因损伤都会造成溶酶体的分解障碍和未消化脂质的积聚（图 4.5）。例如，由于编码 β- 己糖胺酶 A 基因突变，使神经节苷脂 GM2 积满溶酶体引发与泰 - 萨病（Tay-Sachs disease）相关的致命性神经病并发症。因降解葡糖脑酰胺的 β- 葡糖脑酰胺酶基因突变，引发稀有的高歇氏症（Gaucher's disease）神经性并发症。高氏症的症状表现为肝大、脾大和骨骼畸形，主要病因是巨噬细胞中葡糖脑酰胺的积聚。许多高歇氏病患者用酶置换疗法得到了很好的治疗（框 4.1）。因 α- 半乳糖苷酶 A 缺陷引发的法布里病（Fabry disease），是另一种主要发生在外周组织的鞘糖脂贮积病。α- 半乳糖苷酶 A 可以从红细胞三糖脑酰胺 (globotriaosylceramide)（也称作脂酰基鞘氨醇己三糖，ceramide trihexoside）中清除末端半乳糖残基。法布里病中，脂酰基鞘氨醇己三糖在血管内皮细胞中的贮积，最终导致肾脏和心脏器官的损伤。

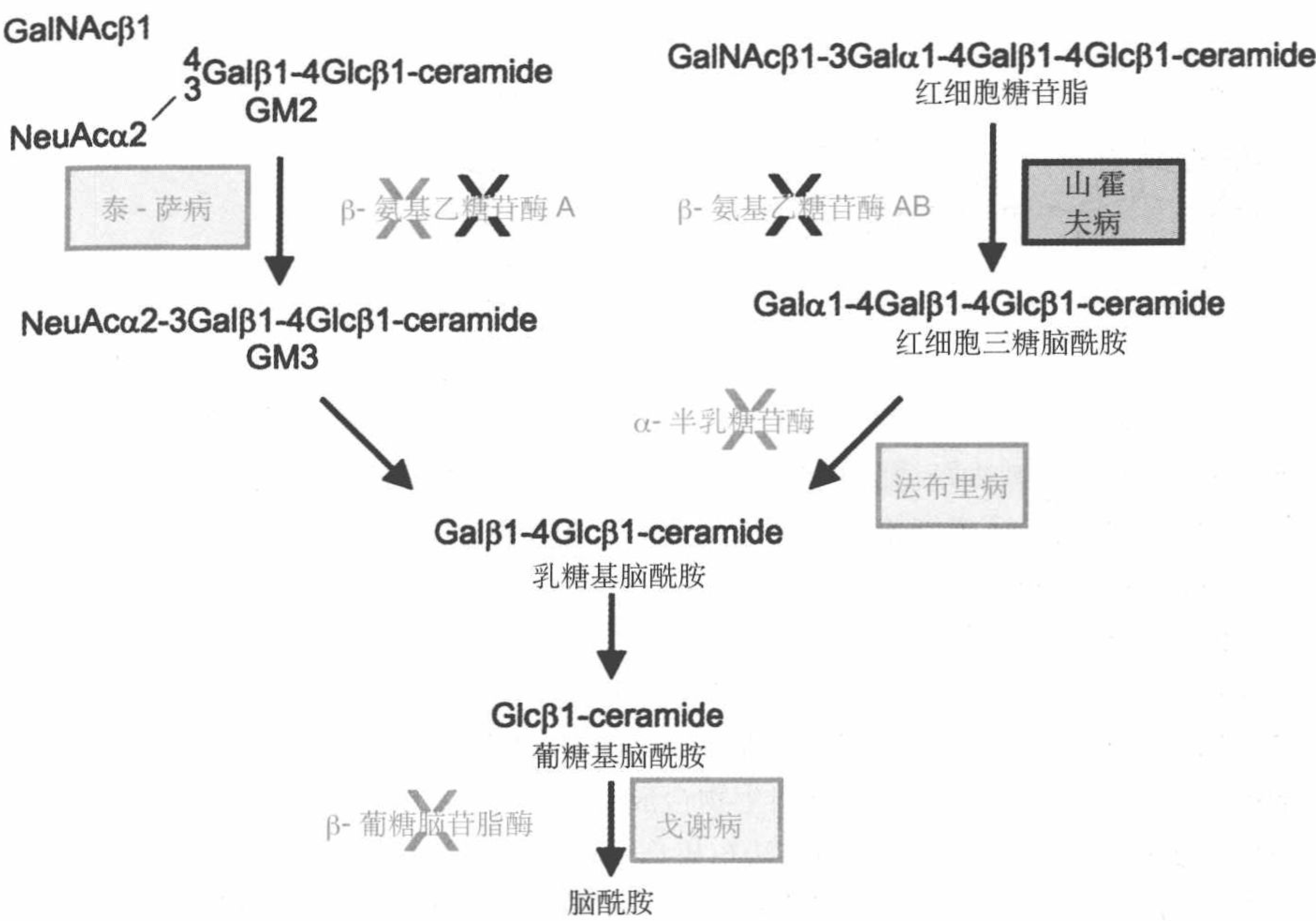
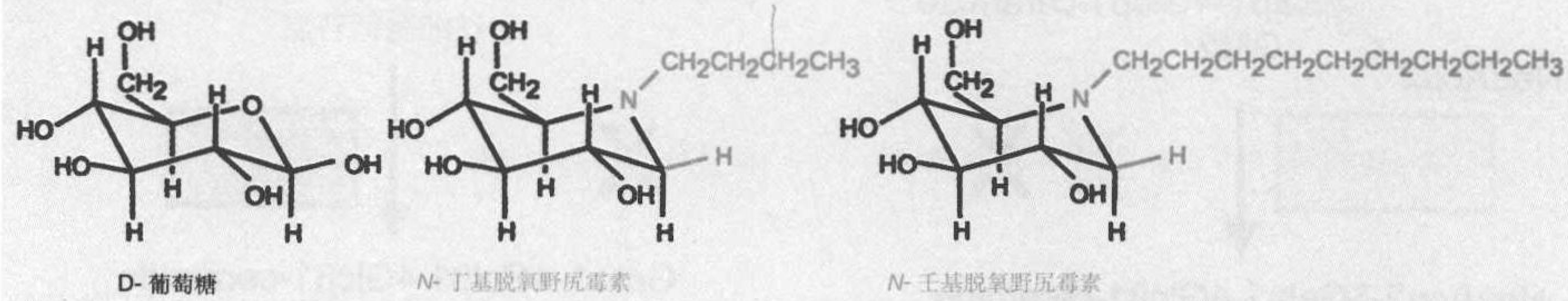


图 4.5 糖脂分解缺陷导致溶酶体贮积失常。每失去一种酶导致本应正常分解糖脂的积聚。山霍夫病（Sandhoff disease）的情况是失去了 β- 氨基己糖苷酶 A 和 B，导致神经节苷脂 GM2 和红细胞糖苷脂积聚

框 4.1 糖疗法 *酶置换、分子伴侣和糖脂合成抑制剂，用于治疗贮积病*

最常见的糖脂贮积症戈谢病（Gaucher disease）可以用酶置换疗法治疗，方法是通过注射一种纯化的活性酶，置换受损的分解代谢酶。酶置换疗法对多数戈谢病患者有效，因为未消化的糖脂只在患者的外周组织巨噬细胞溶酶体中积聚，不贮积在中枢神经系统。在骨髓、脾脏和肝脏巨噬细胞中注入 β- 葡糖脑苷脂酶，可以分解积聚的葡糖基脑酰胺，制成一种聚糖末端载有甘露糖残基重组形式的 β- 葡糖脑苷脂酶，使这种酶通过巨噬细胞甘露糖受体摄入，能够靶向巨噬细胞溶酶体（第 10 章）。目前法布里氏病也采用新近开发的重组形式的 α- 半乳糖苷酶 A 的置换法进行治疗。酶置换疗法对 2 型戈谢病，或其他在脑中积聚脂质引发致命性神经损伤的某些鞘糖脂贮积病无效，因为这些酶不能跨越血 - 脑屏障，接触不到受损细胞。

另一种使溶酶体获得葡糖脑苷酶正确折叠的方法是改进突变形式酶的折叠，使这些酶能够从内质网出来，驶入高尔基体，并进入溶酶体。突变形式的蛋白质多由结合在活性位点的底物类似物保持稳定。这一相对简单的化合物常以葡萄糖的氨基糖的类似物——脱氧野尻霉素作为基础。它们经常作为酶的竞争性抑制剂，与丁基、壬基或其他烷基链制成可穿越细胞的制剂，可以口服，克服了酶置换疗法需要不断静脉注射的缺点，并且能够进入脑中。与此同时，也在研发用于治疗泰 - 萨病和其他溶酶体贮积病的酶缺陷抑制剂。



第三种治疗糖贮积病的方法着重于防止或减少糖脂的贮积。在底物损失的情况下，可用抑制剂来减少鞘糖脂的生物合成，使少量鞘糖脂接触溶酶体。在多数患者中，分解代谢酶的缺陷还未能使其活性完全消除，如果保持底物的低水平，剩余的低活性就可足够应对降解问题。即使没有了剩余的酶活性，用糖脂合成的抑制剂也可以使未降解物质的积聚变缓，使毒素水平不能产生影响。*N*- 丁基脱氧野尻霉素是目前用来替代酶置换法治疗戈谢病的一种糖脂合成的抑制剂。这种霉素抑制剂用于抑制催化葡糖基脑酰胺合成，即戈谢病糖脂的建构和积聚的脑酰胺专一性葡糖基转移酶。葡糖基脑酰胺是所有葡糖基鞘糖脂生物合成中的前体，因此抑制这种前体的合成就可以减少在泰 - 萨病、山霍夫病和法布里病中合成糖脂的积聚，而且 *N*- 丁基脱氧野尻霉素的疗法已在泰 - 萨病患者中进行临床实验。也许有人会感到意外，减少鞘糖脂的合成在生理上没有产生效果，但用 *N*- 丁基脱氧野尻霉素治疗的戈谢病患者也没有发现任何副作用。

论述题

• 对比三种不同的糖脂贮积病的治疗方法。讨论在研发治疗此类疾病中糖生物学知识的重要性。

主要文献

• Brady, R.O.(2003). Enzyme replacement therapy: conception, chaos and culmination, *Philosophical Transactions of the Royal Socieyt of London B*, **358**, 915-919.

• Ioannou, Y.A., Zeideer, K.M., Gordon, R.E., and Desnick, R.J.(2001). Fabry disease: Preclinical studies demonstrate the effectiveness of α-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice, *American Journal of Human Genetics* **68**, 14-25.

• Platt, F.M. and Butters, T.D.(2000). Substrate deprivation: A new therapeutic approach for the glycosphingolpid lysosomal storage diseases, *Expert Reviews in Molecular Medicine* **February 1**.

• Sawkar, A.R., Schmitz, M., Zimmer, K.P., Reczek, D., Edmunds, T., Balch, W.E., and Kelly, J.W.(2006). Chemical chaperones and permissive temperatures alter the cellular localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants, *ACS Chemical Biology* **1**, 235-251.

4.6 有些蛋白质经糖脂锚与细胞膜结合

有些蛋白质通过与脂肪酸共价结合锚定在细胞膜上，这种结合是一种重要的有别于通过疏水氨基酸序列的锚定方式。哺乳动物中，有 100 多个膜蛋白都是通过糖脂结合在质膜的胞外表面。与糖鞘脂类不同，这类脂质是以二酰甘油（diacylglycerol）疏水结构为基础的。与蛋白质结合的糖脂通常被称为糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚 [glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor]。

不同生物中 GPI 锚的结构虽然不同，但它们具有共同的特征（图 4.6）。桥连在蛋白质和脂质之间的聚糖，通过葡糖胺（GlcN）糖苷键 6 位与脂质肌醇（inositol）头部基团连接。已经证实，糖缀合物中的氨基糖是游离的，而不是乙酰化形式的，是不多见的例子之一。所有已知的脂质锚都有一个含有三甘露糖残基的核心结构。在第三个甘露糖残基上，通过磷酸二酯键与一乙醇胺（ethanolamine）分子连接，暴露的自由氨基与蛋白质中 C 端氨基酸的羧基形成酰胺键。

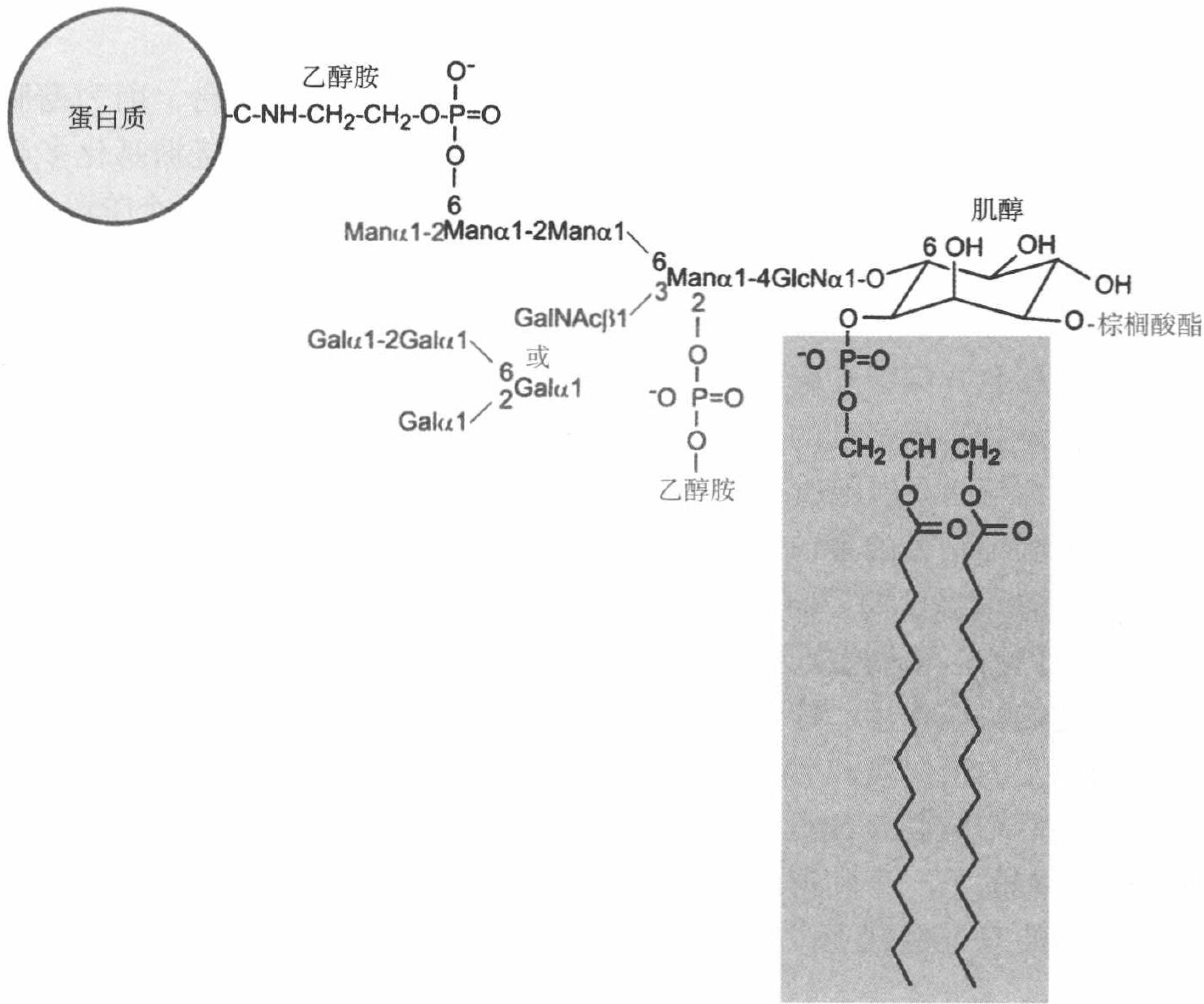


图 4.6 GPI 锚结构图

黑色表示 GPI 锚的共有部分，蓝色表示在不同物种中出现的变化

基础的 GPI 锚可进行多种修饰。不同 GPI 锚的多样性，包括甘油基团上连接的脂肪酸尾部的长度、是否存在与第一个甘露糖残基结合的第二个乙醇胺磷酸残基，以及是否存在直接酯化在肌醇环上的棕榈酸。最早对 GPI 锚的认知，是因为许多以这种方式与膜结合的蛋白质，用磷脂酶 C 处理可以得到释放。但是，因为棕榈酸与肌醇环酯化可以抑制这种裂解反应，磷脂酶 C 的灵敏性不是总能用作蛋白质是否通过 GPI 锚与膜结合的判断实验。

GPI 结构中另一个多变的根源，来自聚糖添加的精细结构。这类延伸结构，可以采取头一个甘露糖残基与单个 GalNAc 残基结合的形式，或者采取与半乳糖残基簇聚的支链形式。因此，聚糖的整体构造与复合型 N-连接寡糖类似，其内部核心结构含 GlcN（Ac）和甘露糖，暴露的外分支含半乳糖和 GalNAc。

4.7 蛋白质在内质网内添加糖脂锚

糖脂锚与蛋白质的结合类似于 N- 连接糖与蛋白质的结合，因为糖脂锚在转移至蛋白质之前，已预先组装成一个单位。和 N- 连接糖基化多萜醇脂核心结构一样，肌醇脂核心结构的建构经过拓扑学不同的两个阶段（图 4.7）。GlcNAc 残基的添加、N- 乙酰基的脱除和某种情况下，在肌醇环上进一步结合棕榈酸，所有这些反应都发生在内质网膜胞质表面。而后，这一结构转移至甘露糖和磷酸乙醇胺进行加成反应的内质网膜腔。多萜醇磷酸甘露糖是甘露糖残基的供体。磷酸乙醇胺的供体通常是磷脂、磷脂酰乙醇胺，一种与脂双层胞质小叶缔合的脂质。

由糖脂锚结合的蛋白质最初是以 I 型穿膜蛋白合成的。这种蛋白质由断裂的 N 端信号序列导向内质网，是最初由 C 端疏水终止转移序列锚固在膜上的蛋白质。糖脂锚连接的形成是一种多肽链断裂和与乙醇胺的氨基形成酰胺键的协同作用。这种转酰胺基作用不需要输入新能量，注定要由转酰胺酶加工的蛋白质 C 端序列由大量非极性氨基酸组成，便于实现其膜锚功能。虽然 C 端氨基酸没有结合糖脂锚相关的专一性序列模体，但在 C 端断裂后所剩的第一个和第二个氨基酸残基一般都有小侧链。在这些前体形式蛋白质的 C 端膜锚上没有紧邻的亲水性的胞质结构域。

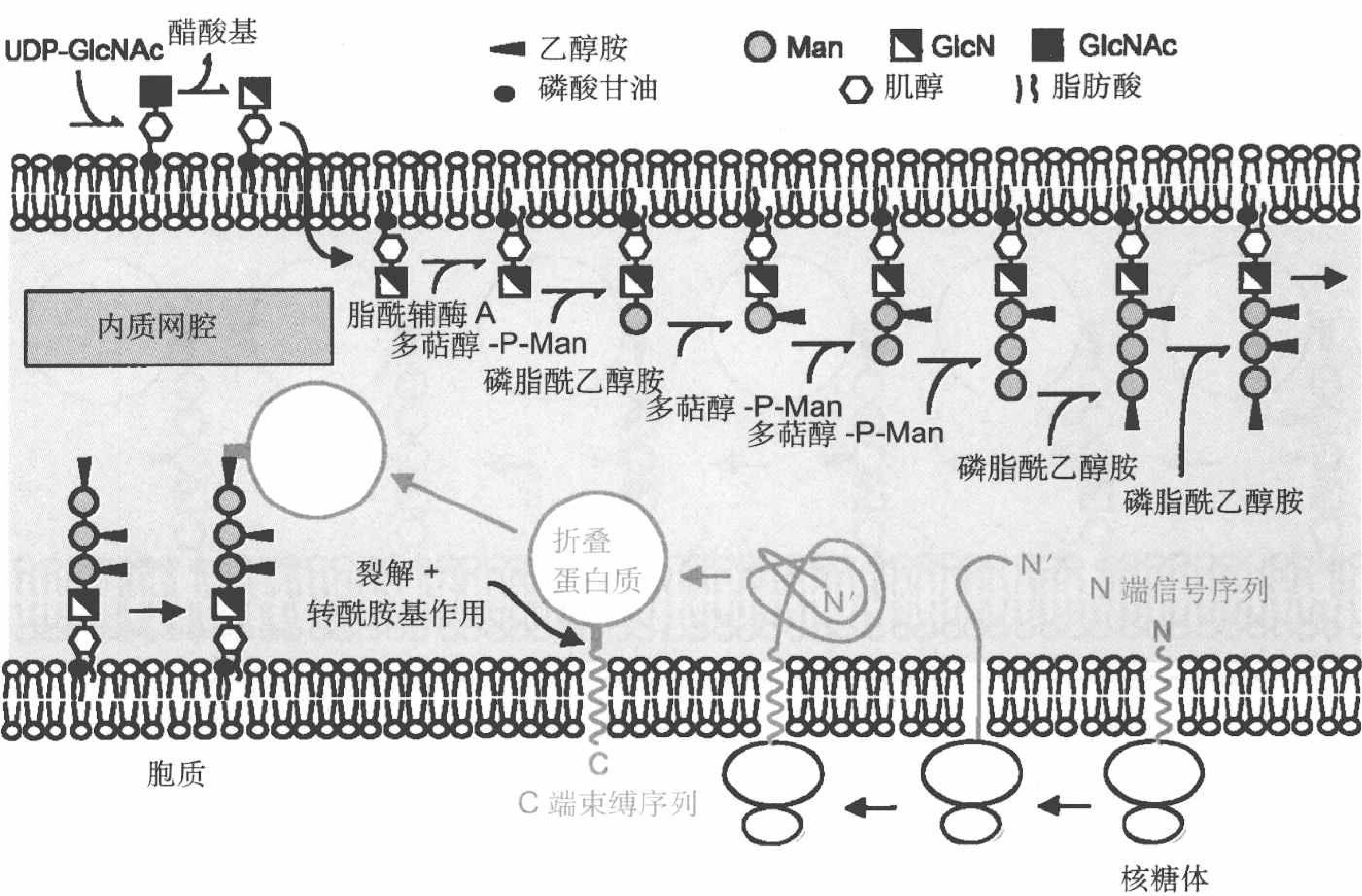


图 4.7 GPI 锚生物合成途径和与蛋白质的结合。GPI 锚的合成起始于内质网膜的胞质侧，完成于腔内表面。蛋白质通过以共翻译方式清除的 N 端信号序列导向腔内，暴露出新的 N 端残基（N′）。翻译终了蛋白质仍由疏水 C 端氨基酸序列约束在膜上。在向糖脂锚转移时，束缚序列经蛋白质水解断裂，暴露的新 C 端氨基酸（C′）直接协同转移至糖脂锚的乙醇胺部分。UDP. 尿苷二磷酸。

4.8 糖脂锚连接的蛋白质定位于质膜

所有通过 GPI 锚连接质膜的蛋白质没有共同的属性范畴。哺乳动物细胞中有各种不同的连接糖脂锚的蛋白质，但没有哪一种蛋白质成为膜的代表性主要组分。所有 GPI 锚定蛋白质的一个共同特征是几乎无例外的定位于质膜。这种分布形式表明，在这些蛋白质上缺失一种胞质结构域，造成介导内吞作用和其他胞内和质膜之间运输事件的装置，难以辨认这些蛋白质。

尽管 GPI 锚定蛋白上缺失面向胞质规定路线的信号，但这些蛋白质都定位于质膜的限定区域。而且多数情况下，脂筏中含有丰富的 GPI 锚定蛋白。GPI 锚的结构控制着通过细胞的移动，因为在 GPI 锚定蛋白质能够离开高尔基体之前，其中乙醇胺基团之一和连接肌醇的脂肪酸必须被清除（图 4.8）。另外，脂质必须在高尔基体内进行重组，使其具有的两个饱和脂肪酸链，这样才能与脂筏缔合。

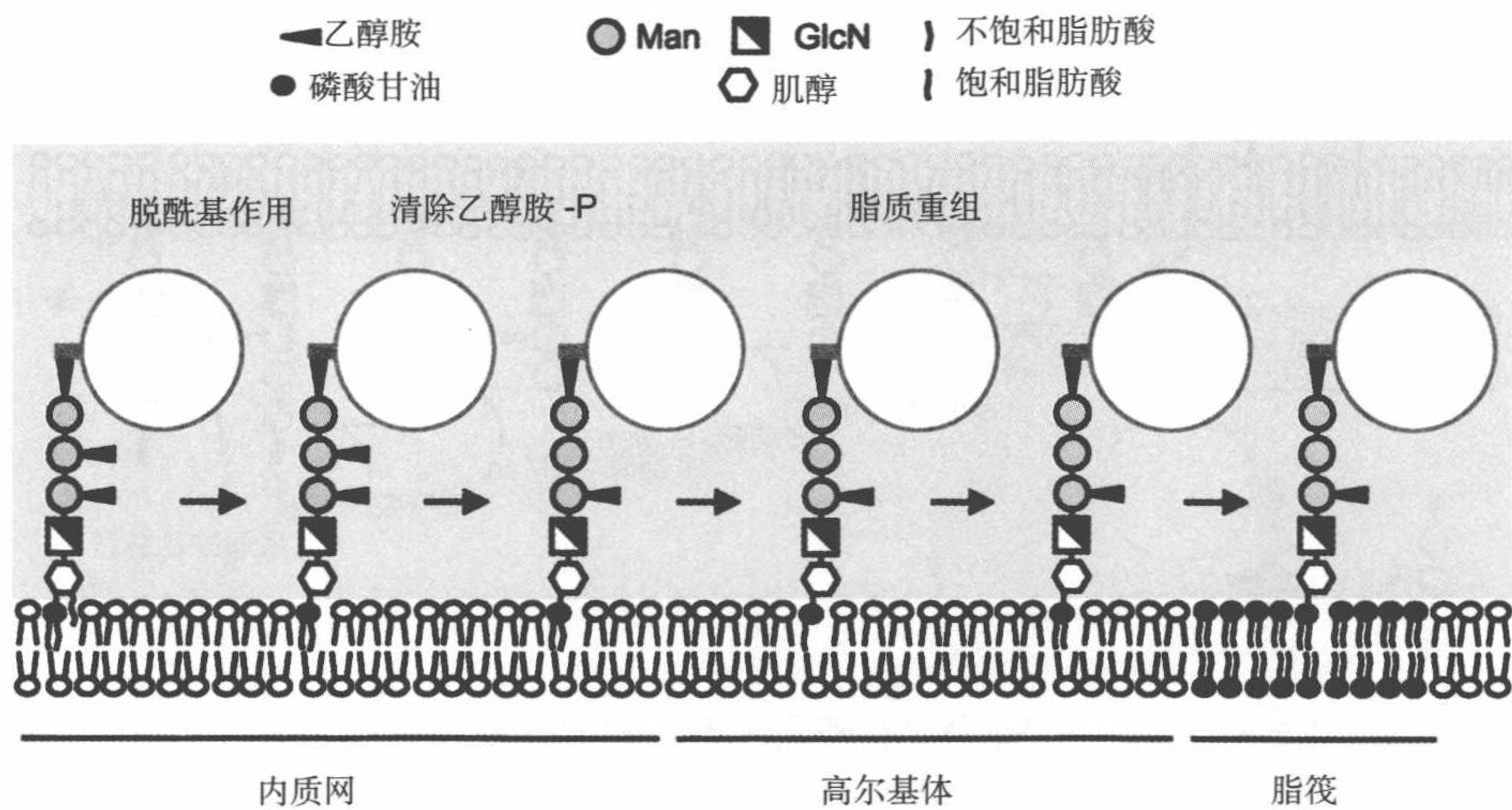


图 4.8 GPI 锚加工与细胞运输之间的关系。为了通过分泌系统需要清除乙醇胺和乙酰基团，同时，为了易使 GPI 锚与脂筏相互作用，需要重组脂肪酸

极性细胞中糖脂连接的蛋白质几乎都是导向细胞顶端表面。因为这一分拣方式不能以暴露于胞质膜表面的信号作为依据，曾有建议正确靶向的信息出现在脂筏形式的脂双层本身。糖脂筏指定靶向质膜顶端小泡的机制还不是很清楚，但是掺入膜片的这些糖脂锚定的蛋白质将被带到细胞的顶端。

➊有关锥虫外壳蛋白质参见 **8.3** 节。

在哺乳动物细胞上，只有少部分质膜中的膜整合蛋白与糖脂锚连接，相比之下，锥虫寄生物表面的外壳蛋白则高比例地以同样方式与糖脂锚连接。最丰富的表面结构即 GPI 连接的变体表面糖蛋白。整体结构相同，但抗原性完全不同的表面糖蛋白由同一基因家族表达。在这些基因表达中出现的反复变化，能使寄生物避开宿主的免疫应答。这种表面糖蛋白的柱状结构可使糖蛋白能够横向排列成密集的系列，有效地屏蔽了宿主对其脂双层表面的识别。由于质膜肯定含有像溶质转运体一类的重要蛋白质，糖脂锚的效用为外壳蛋白提供了一种从细胞表面突出的方式，同时在脂双层中为其他同类蛋白质留出了近膜的空间位置（图 4.9）。

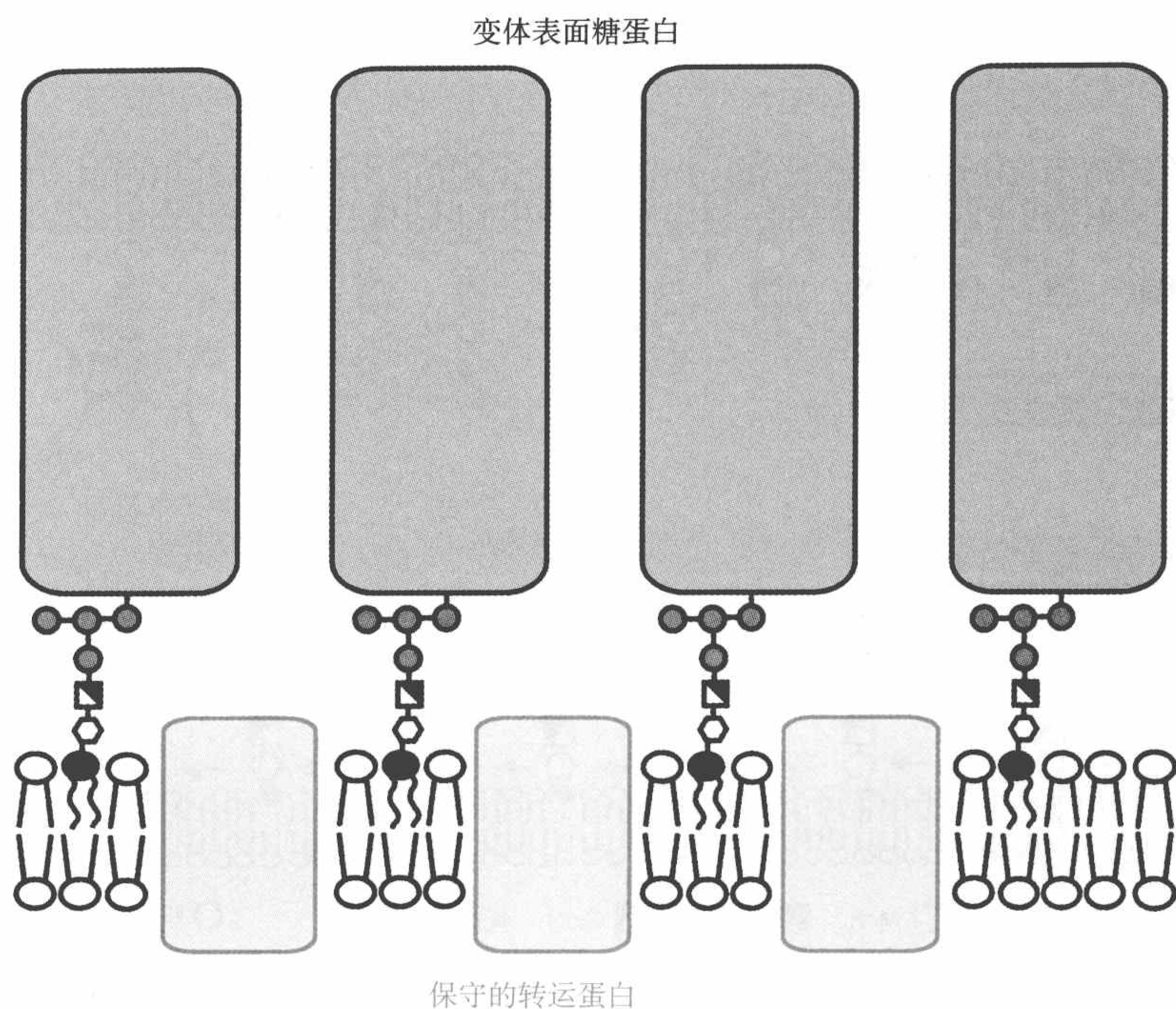


图 4.9 锥虫质膜表面 GPI 锚锚定的蛋白质可作为转运蛋白胞外部分的掩蔽工具。变体表面糖蛋白的外伸堆叠，可以防止抗体进入包埋在脂双层中的蛋白质

框 4.2 糖疗法：*选择性抑制糖脂锚生物合成治疗非洲昏睡病*

已对锥虫质膜表面不同糖蛋白上的糖脂锚进行了深入的研究，其结构和生物合成路线也已得到确认。由舌蝇借布氏锥虫亚种（subspecies of Trypanosoma brucei）微生物作传媒致使每年有数十万人感染非洲昏睡病，使非洲撒哈拉沙漠以南地区的牲畜传染非洲锥虫病。糖脂锚有两个重要特性使其成为研发治疗昏睡病药物的诱人目标。第一个特性，糖脂锚对寄生物在哺乳动物宿主中的生存是必不可少的。曾经采用基因敲除和 RNA 干扰方法进行研究，结果表明在糖脂锚生物合成途径中缺失专一性酶的寄生物，在哺乳动物中不能生存。第二个特性，寄生物和哺乳动物糖脂锚的生物合成途径截然不同。这一特征很重要，这一特性表明，可以选择性靶向攻击锥虫，同时绕开糖脂锚对哺乳动物宿主生存必不可少这一要害问题。通过对比，发现生物合成途径有三处不同。在合成途径起始阶段，从 GlcNAc 去除 *N*- 乙酰基和肌醇环的酰化作用顺序正好相反。在合成途径之后，脱酰化作用和磷酸乙醇胺桥连蛋白质的结合顺序有所改变，只有锥虫中糖脂锚合成途径中的脂肪酸进行了重组（图 A）。这些合成步骤成为研发抑制剂的最好目标，这种抑制剂只对寄生物的酶产生影响，对哺乳动物的酶没有影响。

图 A

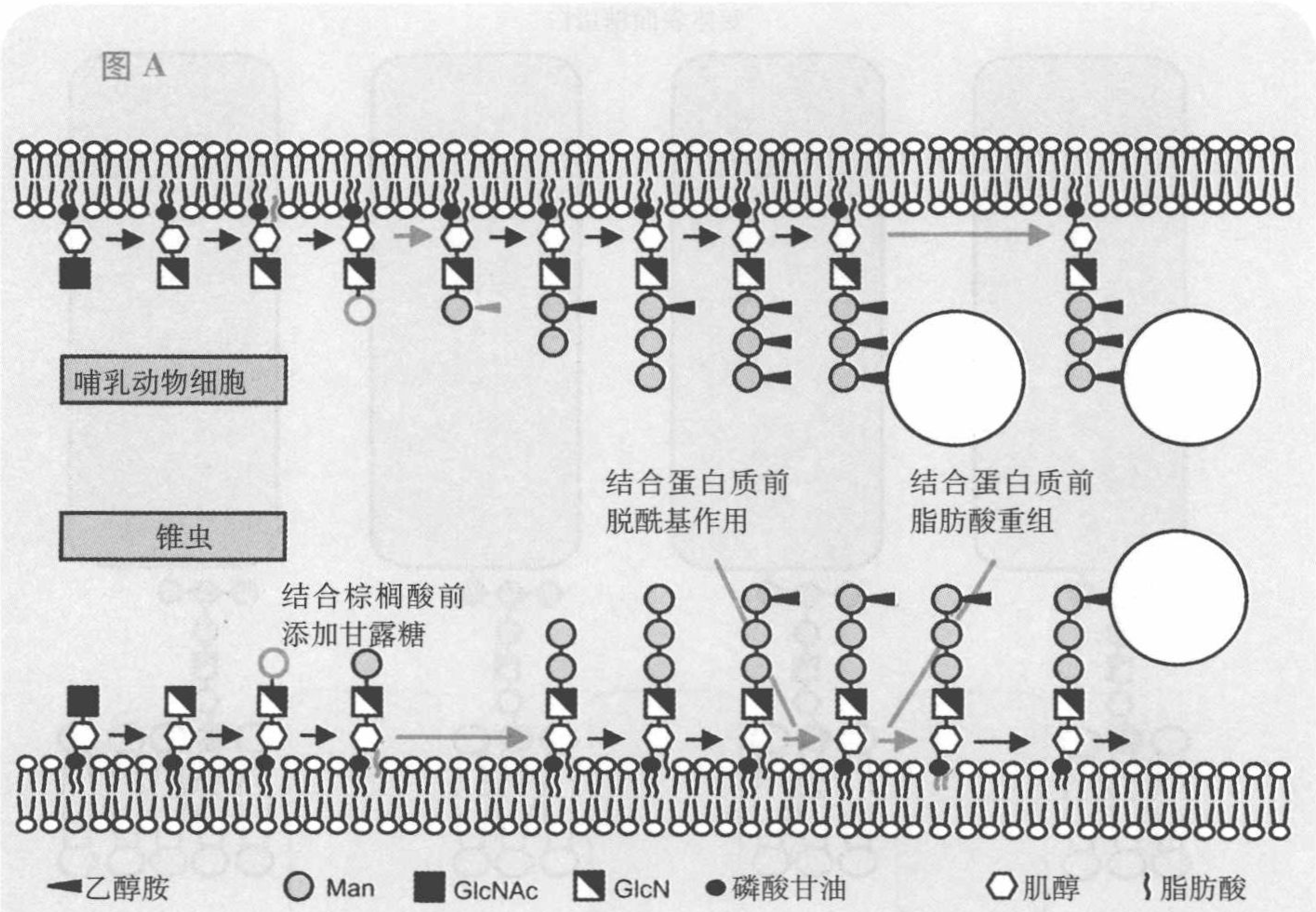
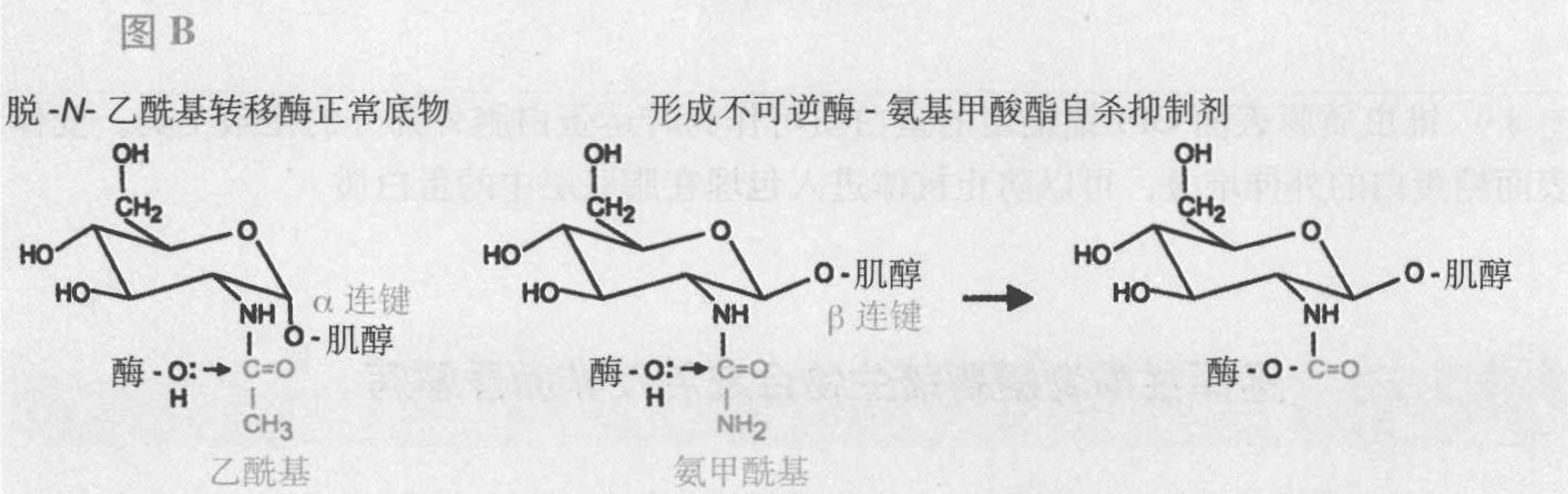


图 B



寄生物中 GlcNAc 脱 -*N*- 乙酰基酶比人的这种酶可以接受更广泛的底物，利用这一事实，目前正在研究选择性抑制寄生虫生物糖脂锚生物合成途径的一些可能的抗寄生生物化合物。载有 *N*- 氨甲酰基的底物类似物，通过与酶活性位点共价反应的自杀底物作用，可以抑制人和锥虫的脱 -*N*- 乙酰基酶。但是 GlcNAc 分子与肌醇是 β 连键，不同 α 连键，或者在肌醇环上含有甲基的 GlcNAc 分子才只能作为寄生物酶的底物。因此，*N*- 氨甲酰基与这些底物的结合可以作为寄生物酶的选择性抑制剂（图 B）。虽然这些抑制剂的浓度低至 8nmol/L 时就可以起作用，但在活体内，这些抑制剂的作用无效。因为其荷负电的磷酸基使抑制剂不能渗透膜。解决这一问题的办法是在磷酸基上连接能够中和负电荷的乙酰甲基，而且胞质酯酶可以有效地清除乙酰甲基。葡糖胺上含游离氨基的保护性化合物能够进入细胞，并在途径中继续用酶修饰，因此，如用氨基甲酸衍生物共价抑制剂有望能够杀死锥虫。

论述题

• 试论糖脂锚生物合成途径对锥虫在哺乳动物宿主中生存必不可少，但对其在

昆虫宿主中生存并不重要的观点，提出基因和化学方面的证明。

• 比较锥虫专一性抑制剂研发阶段中涉及的针对 GPI 锚早期和晚期生物合成的阻断，其中晚期包括第二和第三个甘露糖的添加。

• 利用糖脂锚生物合成中锥虫专一性抑制剂的研究作为模型，讨论在开发抗真菌制剂中同样可以应用的策略。

主要文献

• Ferguson, M.A.J.(2000). Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug tatget for African sleeping sickness, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **97**, 10673-10675.

• Grimme S.J., Colussi P.A., Taron C.H., and Orlean P.(2004). Deficiencies in the essential Smp3 mannosyltransferase block glycosylphosphatidylinositol assembly and lead to defects in growth and cell wall biogenesis in *Candida albicans, Microbiology* **150**, 3115-3128.

• Smith, T.K., Crossman, A., Borissow, C.N., Paterson, M.J., Dix, A., Brimacombe, J.S., and Ferguson, M.A.J.(2001). Specificity of the GlcNAc-PI de-*N*-acetylase of GPI biosynthesis and synthesis of parasite-specific suicide substrate inhibitors, *EMBO Journal* **20**, 3322-3332.

• Smith, T.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S., and Ferguson, M.A.J.(2004). Chemical validation of GPI biosynthesis as a drug target against African sleeping sickness, *EMBO Journal* **23**, 4701-4708.

• Urbaniak, M.D., Yashunsky, D.V., Crossman, A., Nikolaev, A.V., and Ferguson, M.A.J.(2008). Probing enzymes late in the typanosomal glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway with synthetic glycosylphosphatidylinositol analogues, *ACS Chemical Biology* **3**, 625-634.

4.9 糖脂锚失常引发阵发性夜间血红蛋白尿症

糖生物学与疾病**血红蛋白尿症**

阵发性夜间血红蛋白尿症与血红细胞失去 GPI 锚有关，GPI 锚的失去是因为编码催化 GPI 锚生物合成第一步骤 GlcNAc 转移酶 PIG-A 基因中的突变。由于这种突变不是出现在种系细胞，而是发生在骨髓干细胞中的体细胞，这是一种获得性疾病。阵发性夜间血红蛋白尿病的症状，正如病名所表明的，病因是由于红细胞在补体系统意外激活之后的溶血作用。正常情况下，可以通过包括 CD55（也称蜕变加速因子）和 CD59 在内的一系列红细胞表面蛋白防止补体的这种误导的激活作用。这些表面蛋白都与 GPI 锚连接。如果 GPI 锚没有连接红细胞表面蛋白，这些蛋白质就不能出现在细胞表面，从而会发生低水平的补体随机激活。从具有 PIG-A 突变基

因干细胞发育的白细胞，在GPI锚定的细胞表面蛋白质中也有缺陷，但白细胞上的这种缺陷似乎不是致病的原因。红细胞上GPI锚定的蛋白质清楚地表明，对阵发性夜间血红蛋白尿症具有主要作用。但是，从分析这种病的症状来看，还不能对GPI锚的功能下任何结论，因为糖脂锚除了在血液细胞出现异常外，在其他细胞上都是正常的。

小 结

对膜聚糖结构的了解远胜于对其功能的了解。胞膜糖基化对细胞生存发育能力并不是必不可少的，这一发现更坚定地证实，多数聚糖是在有机体背景下，而不是在细胞背景下起作用。清楚地了解细胞膜糖缀合物能够通过细胞表面的物理性能和约定的专一性识别事件的影响，介导和调节细胞与细胞之间的相互作用。有关聚糖在这两方面的功能将在8~10章详细讨论。

主要参考文献

Ferguson, M. A. J. (1999). The structure,biosynthesis and functions of glycosylphosphatidy-linosito[anchors,and the contributions of trypanosome research, *Journal of Cell Sconce* **112**. 2799-2809. 本文详细评论了锥虫中GPI-锚蛋白。

Fujita, M. and Kinoshita, T.(2009). Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins, *FEBS Letters* **584**,1670-1677. 提出GPI-锚生物合成途径，并附有蛋白质通过细胞移动进入脂筏的证明。

Landolt_Marticorena, C. and Reithmeier, R. A. F. (1994). Asparagine-linked oligosaccharides are localised to single extracytosolic segments in multi-span membrane proteins, *Biochemical Journal* **302**, 253-260. 本文详查了哺乳动物中广布种膜蛋白糖基化位点并得出一般性结论。

Lingwood, D. and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organising principle, *Science* **327**, 46-50. 本文讨论了脂筏物化性质和如何使脂筏结合在一起。

Lopez, P.H.H. and Schnaar, R.L. (2009). Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation, *Current Opinion in Structural Biology* **l9**. 549-557. 评判性地分析糖脂主要功能。

McConnville, M.J. and Ferguson, M.A.J. (1993). The structure. biosynthesis and function of glycosylated phosphatidyl inositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes, *Biochemical Journal* **294**, 305-324. 详细评论了GPI-锚蛋白。

Merrill, A. H., Jr., Wang, M.D Park, M. , and Sullards, M. C. (2007). (Glyco)

sphingolipidology：an amazing challenge and opportunity for systems biology, *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 457-468. 鞘糖脂结构和生物合成复杂性的评论。

Schwarzmann, G. and Sandhoff, K. (1990). Metabolism and intracellular transport of glyco sphingolipids, *Biochemistry* **29**, 10865-10871. 鞘糖脂代谢的生物化学和细胞生物学的评论性文章。

Tomita, M. (1999). Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Biochimica et Biophysica Acta* **1455**, 269-286. 详细评论了糖脂锚缺陷疾病症状的基因和生化基础。

Winchester, B., Vellodi, A. and Young, E. (2000). The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment, *Biochemicat Society Transactions* **28**. 150-154. 糖脂储积病简明扼要的评论和治疗的可能性。

Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K. , and Proia, P.L. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **96,** 9142-9147. 本文描述了敲除葡糖基脑酰胺合酶基因小鼠的表型防止鞘糖脂的合成。

习　题

4.1　O- 连接和 N- 连接聚糖糖脂的生物合成途径之间有哪些异同?

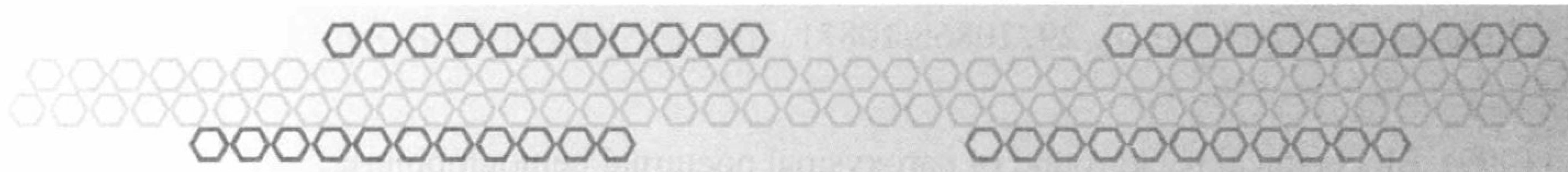
4.2　进入 www.genome.jp/kegg/pathway.hfm 网站 KEGG 途径数据库，研究鞘糖脂新陈代谢。特别对神经节苷脂生物合成进行研究，注重构建于乳糖基脑酰胺的许多不同的结构。点击其号码，你可以从某些酶中获取更多的信息。为合成神经节苷脂系列需要多少唾液酸转移酶?

4.3　对比连接于糖脂和连接于糖蛋白的聚糖的结构和功能。

4.4　论述富集至质膜微结构域的神经节苷脂如何调节信号传送途径。

导读文献：Allende, M.L. and Proia, R.L. (2002). Lubricating cell signaling pathways with gangliosides, *Current Opinion in Structural Biology* **12**，587-592.

5 糖基化反应中的酶学和细胞生物学



学习目的
学习本章后应知内容：

1. 如何采用生物化学、新型克隆策略和基因组学方法联合鉴定需要糖基化的蛋白质
2. 聚糖生物合成途径的拓扑和机械特点
3. 细胞中聚糖生物合成途径的组织及其建构
4. 突变细胞系和敲除小鼠在建立糖基化生物学功能基本理念中的重要意义

细胞中糖蛋白和糖脂的合成方式可以提供如何编码这类结构的重要信息。对糖缀合物生物合成了解的巨大进步，得益于分子生物学和细胞生物学两学科齐头并进的发展。在这一章中，总结了鉴定聚糖生物合成途径中酶的重要步骤，随后，对这些步骤如何在细胞分泌途径中整合进行了讨论。这方面的知识可以促进对糖缀合物结构的人工操控，促成其在实验研究和疾病治疗上的应用。

5.1 用生化方法只分离出几种数量充足的真核细胞糖基转移酶

多数糖基转移酶都可以在遍及全身的细胞中表达，但能在特定组织中高水平表达的这种酶为数不多。半乳糖基转移酶是一个例外，可以在乳腺组织中高水平地表达，成为早期鉴定这类酶时的突破性先例，在该组织中形成乳糖合成酶（lactose synthetase）两亚基之一，乳糖合成酶利用 UDP-Gal 作为供体和葡萄糖作为接纳体合成乳糖（图 5.1）。由两个亚基组成的乳糖合成酶，可以用常规色层法，以可溶性方式从乳汁中分离，这两个亚基都是合成乳糖必需的活性单位。但是，解离的亚基 A，能够起到半乳糖基转移酶的作用，利用载有暴露的 GlcNAc 糖蛋白作为接纳体，并形成

Galβ1-4GlcNAc 末端连键。以游离形式 α- 乳清蛋白 (α-lactalbumin) 蛋白质出现在牛奶中的亚基 B，可以作为改变接纳体专一性为葡萄糖的特定蛋白质。因此，从乳汁中纯化获取乳糖合成酶并解离为 A 和 B 亚基，已成为半乳糖基转移酶蛋白的主要来源。利用针对亚基 A 培育的抗体，从乳腺表达文库分离的全长蛋白质克隆编码 Ⅱ 型穿膜蛋白（type Ⅱ transmembrane protein）。这一全长半乳糖基转移酶出现在高尔基体。乳汁中这种可溶性乳糖合成酶亚基 A 是由蛋白质裂解释放的腔内结构域。

唾液酸基转移酶是另一仅有的能从哺乳动物组织直接纯化得到的糖基转移酶。颌下腺是酶的丰富来源，因为产生这种酶的黏蛋白组织上有大量的唾液酸化 O- 连接聚糖。这些酶对低分子质量的接纳体不起作用，但可以通过酸处理清除唾液酸化黏蛋白，使其暴露末端半乳糖残基，用于检测活性（图 5.2）。需用去垢剂溶解胞内各种形式的酶，而且纯化这些酶的一个关键步骤需使用底物类似物亲和层析。树脂基接纳体类似物的亲和层析效果不好；相反，作为 CMP-NeuAc 供体模拟部分的固定化 CDP 的效果更好。除从颌下腺取得的 α2-3 唾液酸基转移酶可用这种方法纯化外，另有两种唾液酸基转移酶也可以用这种方法纯化，取得充足数量的蛋白质用于部分序列分析和克隆。所有这类酶都是 Ⅱ 型穿膜蛋白，但它们的共有序列占总体序列不超过 15%，预计稍多于不相关的蛋白质。但是，被称为唾

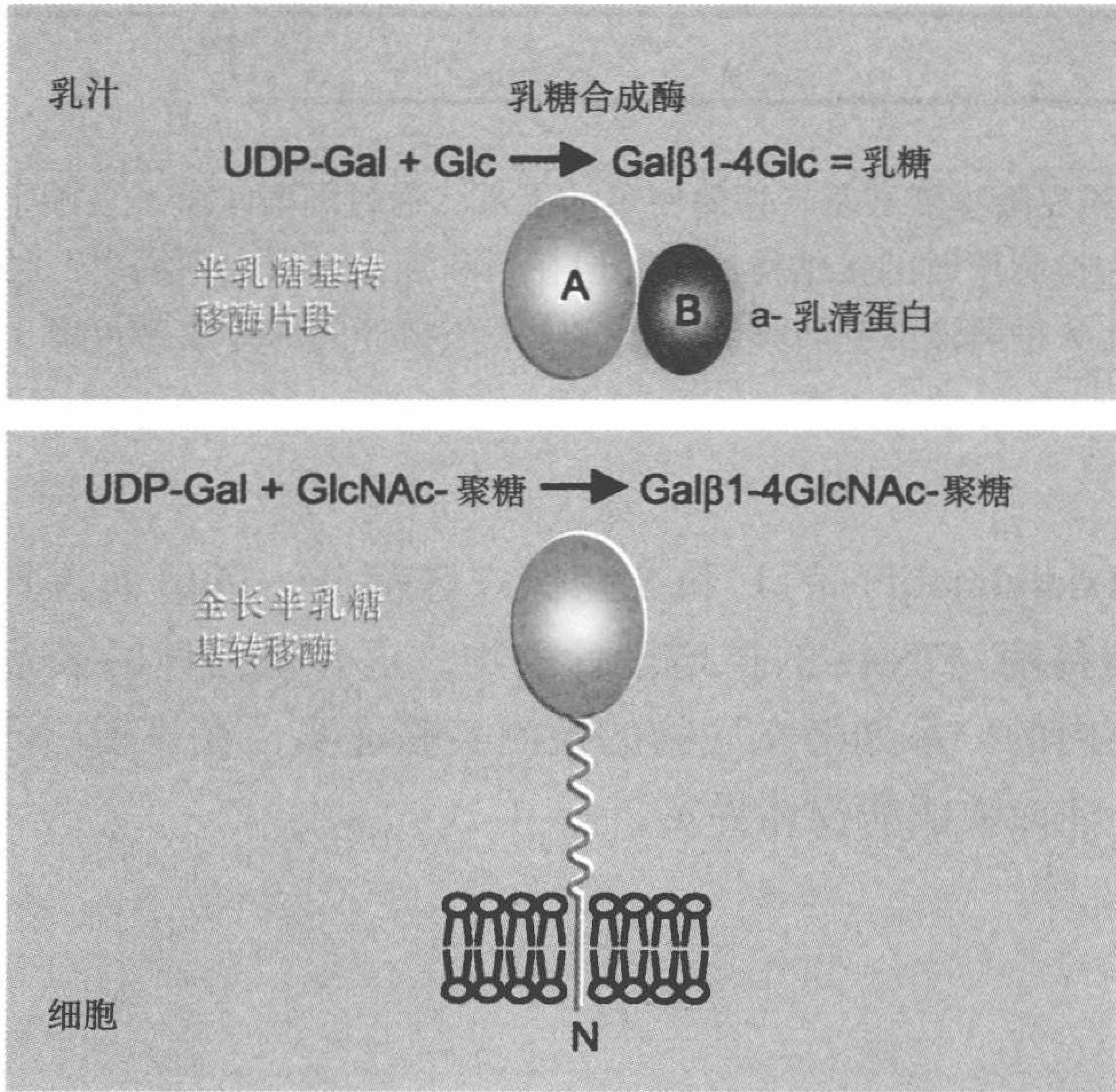


图 5.1 乳汁乳糖合成酶和细胞半乳糖基转移酶的组织结构。通过蛋白质裂解高尔基体半乳糖基转移酶，以可溶性方式释放催化域，并与修饰蛋白质 α- 乳清蛋白复合，呈现乳糖合成酶活性

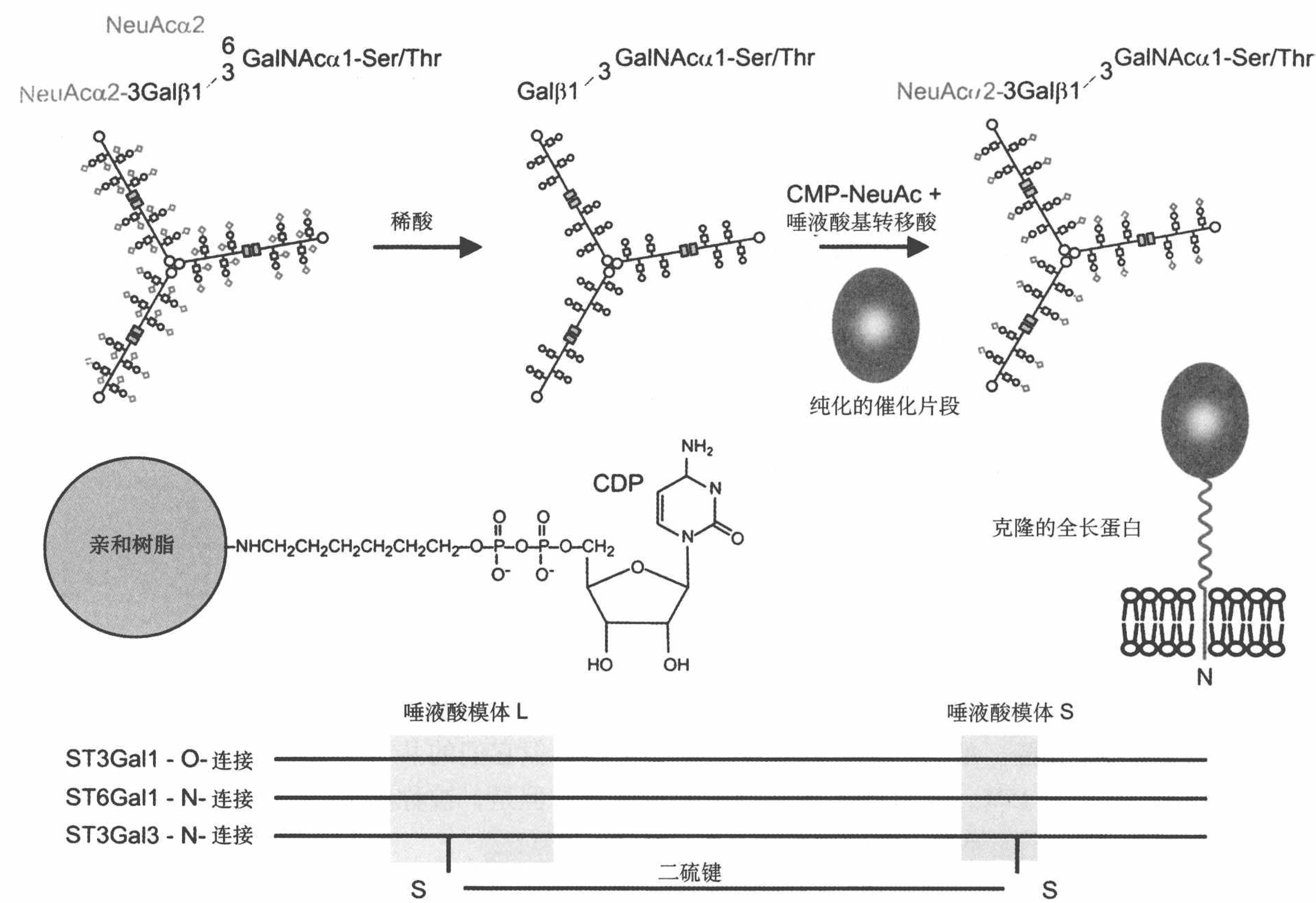


图 5.2 分离和克隆唾液酸基转移酶使用的工具。通过弱酸水解，去除了唾液酸残基的黏蛋白可作为检测酶时的接纳体底物，但在亲和纯化过程中则需用一种供体底物类似物。通过对比 3 种唾液酸基转移酶，形成唾液酸模体的保守残基可用于鉴定家族的新增成员

液酸模体（sialylmotif）的 L 和 S 两保守区部分，可用于为其他与聚合酶链反应的转移酶 cDNAs 的扩增设计引物。这些蛋白质的表达和包括糖蛋白和糖脂在内的一系列潜在底物的检测实验证实，在该蛋白质家族中，接纳体的专一性由唾液酸模体界定。

5.2 克隆新糖基转移酶需用分子生物学新方法

用生化方法纯化半乳糖基转移酶、唾液酸基转移酶和 GlcNAc- 转移酶

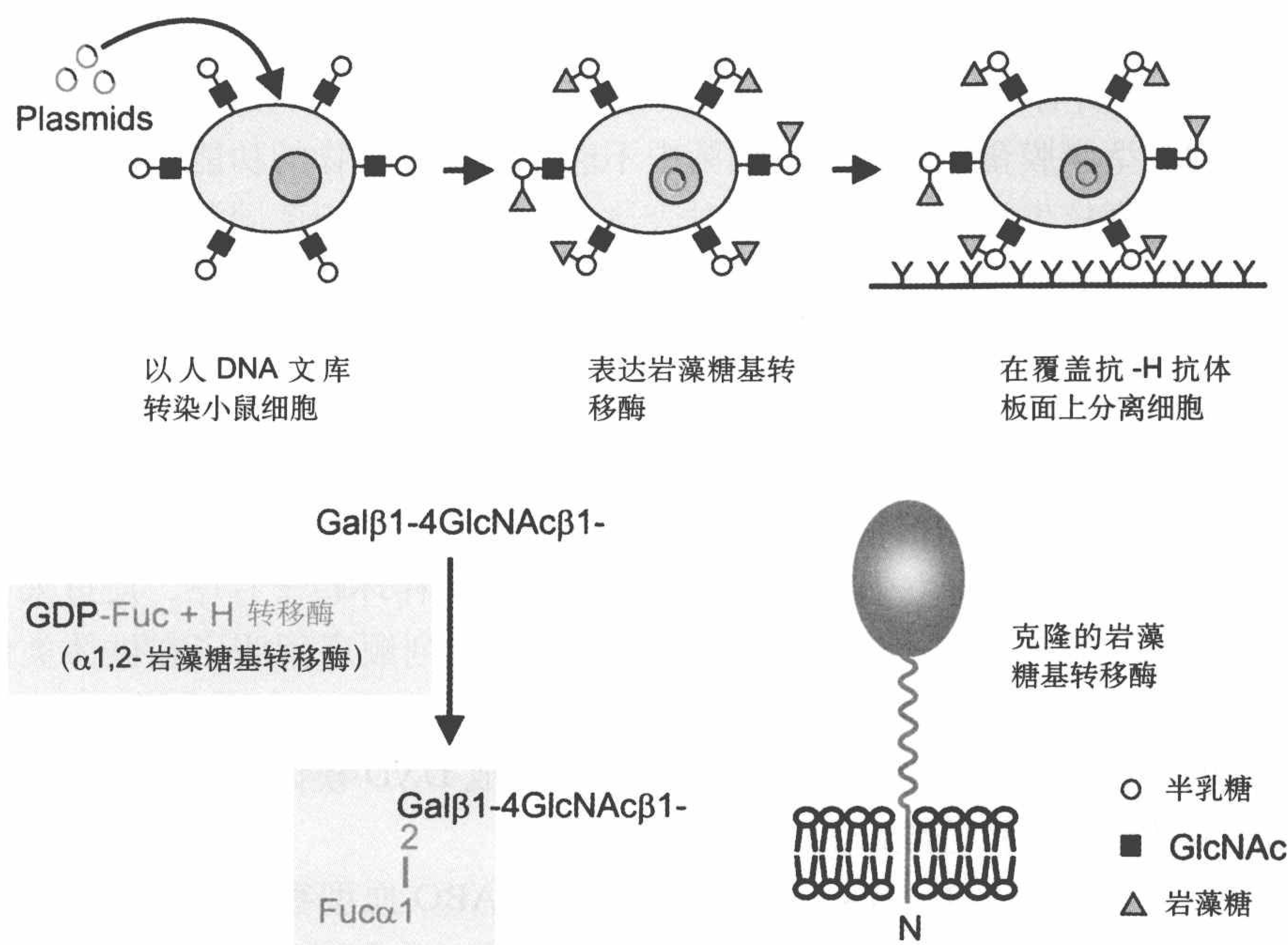


图 5.3 ABO 血型系统中为产生 H 物质所需岩藻糖转移酶基因的分离。转染一组人基因进入不能生成 H 聚糖的小鼠细胞之后，筛选能够黏附识别这一聚糖抗体的细胞

对这些酶的酶学有了更深的了解，虽然因为多数糖基转移酶的数量不足，在纯化和克隆研究策略上受到限制，但在用抗体研究这些转移酶在细胞内的定位，还是取得了进展。真核生物细胞的基因转移克隆新策略为糖基转移酶的鉴定提供了另一条重要路线（图 5.3）。在这一方法中，不表达专一性糖基转移酶的细胞，但这些细胞可以使糖蛋白或糖脂成为接纳体，可以从表达载体中形成的基因组文库转染克隆，然后还可以筛选出由这种酶产生的产物聚糖。小鼠细胞适合作为人血型 H 转移酶克隆的接收者，因为小鼠不能生成 H 寡糖。采用从不能生成 H 寡糖，因而对其产生抗体的稀有孟买血型个体筛选的抗体检测酶的活性。经过几轮的反复筛选分离出表达 H 抗原的个别克隆，并在转染细胞的溶解物中出现预计的岩藻糖基转移酶活性。

➲更多有关孟买血型参见 2.7 节。

利用聚糖专一性凝集素和抗体作为检测试剂，同样可以克隆哺乳动物的其他糖基转移酶。鉴定参与聚糖生物合成的其他一些蛋白质，包括参与糖链加工的糖苷酶，同样需用特殊的生化和克隆联合技术。例如，鉴定核苷酸糖转运体就是在脂质重组方法的基础上发展起来的，证实了转运体具有转移糖供体穿越膜的能力。

5.3 结构上多样化糖基转移酶的共同特征

尽管所有已知真核生物糖基转移酶的总体序列各不相同，但都具有共同的Ⅱ型穿膜蛋白质构造。细菌中不能表达真核生物的功能性糖基转移酶，但在真核生物表达系统中，对表达酶的研究和对细菌同源物分析的研究为这些酶如何作用揭示了关键结构基础。哺乳动物糖基转移酶除在膜中具有共同的配置外，按结构还分成两大类，在每一类中，催化域的折叠与细菌酶的折叠相似，而细菌酶是将糖基转移到寡糖和其他受体如抗生素上的。

多数糖基转移酶的催化中心具有共同的特征。特征之一是按顺序结合底物，首先结合的是核苷酸糖供体，导致无序的袢环趋于有序，反过来又为接纳体底物创设结合位点（图 5.4）。这种排列顺序阐明了在供体类似物上采用亲和层析法纯化糖基转移酶，要比在接纳体上更容易成功。另一共同的特征是一对酸性残基以特征性间隔构成 DXD 模体，后者通过金属离子的桥连，与核苷酸糖供体结合。

有关 ABO 血型参见 2.7 节。

曾对结合末端 GalNAc 和半乳糖残基的 ABO 血型寡糖的糖基转移酶进行了深入的研究。在转移酶 A 和 B 之间，有 4 个氨基酸不同。改变全部 4 个残基，能将转移酶 A 的 GalNAc 的特异性变成转移酶 B 的半乳糖特异性。

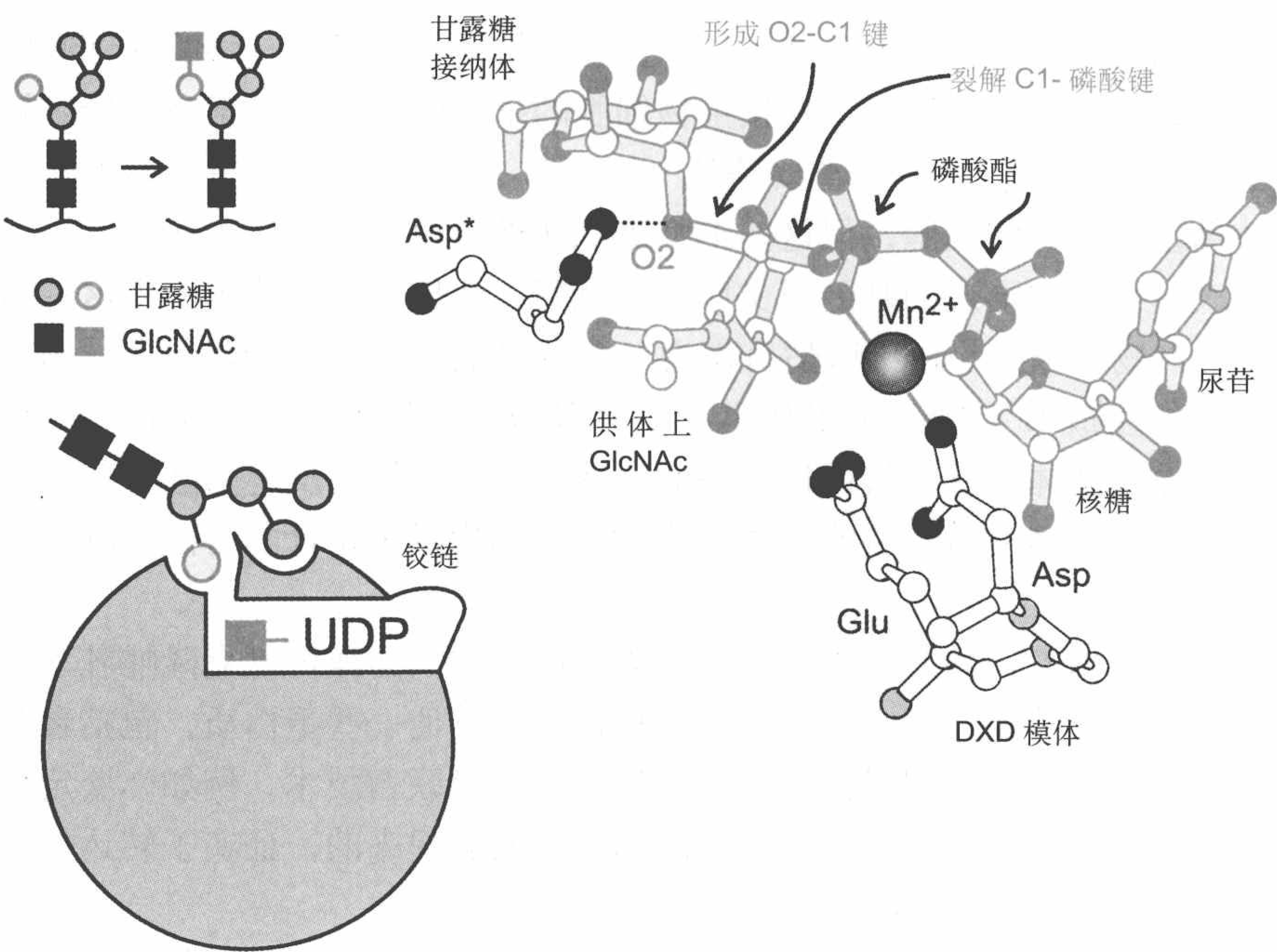


图 5.4 在部分剪切的高甘露糖型寡糖上添加 GlcNAc 残基 GlcNAc 转移酶 I 的结构。UDP-GlcNAc 供体底物首先进入结合位点，在铰链区的构象变化在供体顶部产生接纳体底物的结合位点。介导结合核苷酸糖供体的 DXD 模体，是糖基转移酶的特性。Asp* 催化这一转移反应（据蛋白质数据库 1FOA 条目）

事实上，只在供体结合位点将 Leu266 改变为 Met, 将 Gly268 改变为 Ala, 就可以完成这种特异性的变换，原因可能是长侧链阻止结合庞大底物（图 5.5）。但是，在转移酶 B 中进行反向改变，并不能使其转变为 A 酶活性，其他形式的突变组合则形成酶的双重专一性。

5.4 基因组学用于界定糖基转移酶全部谱系

专一性糖基转移酶中存在共同的序列特征，如唾液酸模体，为鉴定各家族新成员提供了一种筛选人类基因组序列的方法。这方面的研究，为出现在人和其他生物体糖基化酶的全体成员数目确定了界线。一般情况下，序列通常可以预测专一性酶的供体，而不是预测接纳体。界定接纳体需要的实验方法是利用预计编码糖基转移酶基因所表达的蛋白质。这种实验方法目前正处于研发阶段，但是这类方法可单独地用于测试向底物转移糖，或在聚糖阵列测试板上应用。

➲有关糖基转移酶基因组学参见 6.5 节。

➲有关聚糖阵列参见 6.7 节。

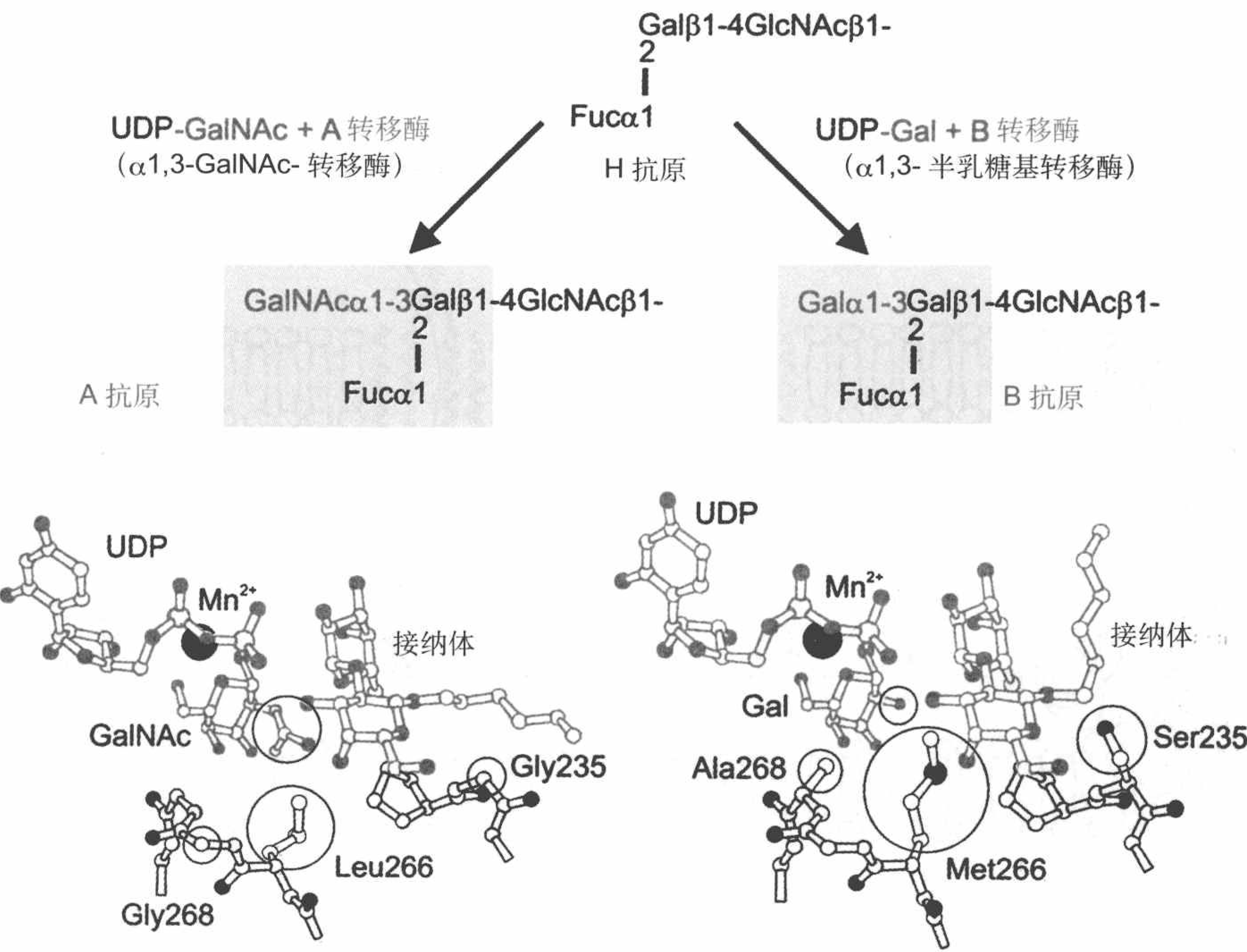


图 5.5 转移酶 A 和 B 之间的区别。在 266 位和 268 位氨基酸的取代反应，能改变酶 A 以 UDP-GalNAc 为底物改为 UDP-Gal 为底物的专一性，原因可能是在这些位置上的长侧链与 GalNAc 2 位的庞大取代基发生冲突 [据蛋白质数据库 1LZI 和 1LZJ 条目及参考文献：Patenaude,S. I.,Seto,N.O.L.,Borisova,S. N.,Szpacenko,A.,Marcus,S. L.,Palcic,M.M.,and Evans,S. N.(2002)The structural basis for specificity in human ABO(H)blood group synthesis, *Nature Structure Biology* **9**,685-690]

5.5 供体底物与糖基转移酶的接触需要特殊的转运体

在 N- 连接聚糖和糖脂生物合成初始阶段，通过翻转酶使多萜醇连接糖的头部基团暴露给腔内区室，使供体底物进入内质网中的糖基转移酶所在区室界定糖蛋白和糖脂生物合成途径中转运体的分子身份性依然是一件难解的神秘事物。在生物合成过程和发生在高尔基体内 O- 连接糖基化过程的后期，起作用的这些糖基转移酶都是利用核苷酸糖作为底物。由于这些供体都在胞质中合成，因此需有一组特殊的转运体将供体转送到酶在膜腔内侧的活性部位。

关于糖基化的拓扑结构参见 2.3 节。

从高尔基体小泡中分离的转运体都是些通过糖基转移酶释放的无糖核苷酸交换核苷酸糖供体的反向转运蛋白（图 5.6）。至于用糖基转移酶研究转运体作用时重要的一种工具是利用基因转移矫正细胞中缺失专一性转运体的缺陷。例如，通过转染缺少这种活性的酵母细胞鉴定 UDP-GlcNAc 小鼠转运体基因。与糖基转移酶一样，糖核苷酸转运体也有共同的结构特征，其中包括存在多个穿膜序列，通过检查基因组序列，这些序列可作为鉴定新转运体的工具。

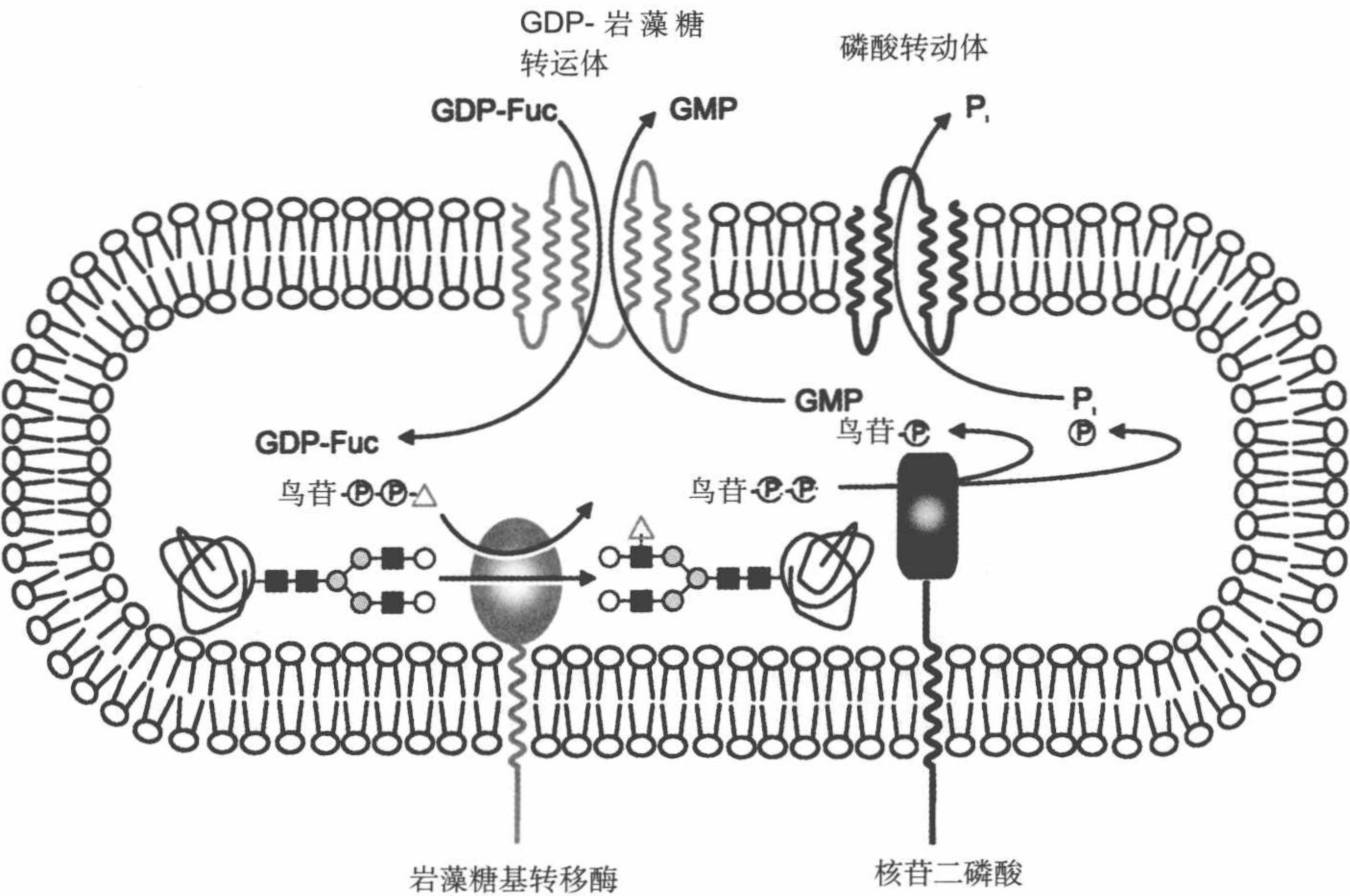


图 5.6 高尔基体内的核苷酸糖转运体。这些无糖单磷酸化核苷酸与核苷酸糖的交换蛋白质转运体，是具有多个穿膜节段的复合型膜整合蛋白质。以形成二磷酸化核苷酸产物的岩藻糖基转移酶和其他糖基转移酶为例，为了能够将核苷酸产物转运返回胞质，必须清除一个磷酸基

框5.1 糖生物学与疾病：*转运体缺陷引发糖基化异常*

通过分析患有罕见的临床综合征Ⅱ型白细胞黏附缺陷（LAD-Ⅱ）患者的细胞，发现了岩藻糖基转移酶转运GDP-岩藻糖供体糖到高尔基体的转运体。LAD-Ⅱ型综合征患者的症状表现为智力迟钝，因骨骼畸形而导致身材矮小和引发细菌易感性的免疫缺陷。分析患者的糖蛋白显示缺失含岩藻糖的聚糖，由于患者不能合成起始的H结构，不具有常人所有的ABO血型，而是罕见的"孟买"血型（第2章）。

由于白细胞黏附作用缺陷，导致LAD-Ⅱ型患者对传染的易感性增强，原因是患者的循环系统含有高水平的嗜中性粒细胞和其他白细胞，这些细胞不能迁移到血流外面，进入组织的感染部位。嗜中性粒细胞迁移到循环系统外面，首先要黏附在内衬血管的内皮细胞，这一相互作用由一组结合聚糖受体的选凝素介导，而这组结合岩藻糖基化聚糖的选凝素（参见第9章）是LAD-Ⅱ型患者所没有的。

LAD-Ⅱ型患者的缺陷基因是通过互补作用研究鉴定的，研究中发现转染cDNA进入LAD-Ⅱ的成纤维细胞可以矫正岩藻糖基化缺陷。确定为人GDP-岩藻糖转运体的蛋白质，在胞质中具有10个穿膜区，其氨基和羧基末端均位于胞质区。这种蛋白质可以从合成GDP-岩藻糖的胞质处，将其运送到高尔基体腔内与GMP进行交换。在7个诊断为LAD-Ⅱ儿童患者的GDP-岩藻糖转运体中，发现有5种不同的突变。这些突变有的是因为单个氨基取代作用引起的，导致转运体丧失功能，或者是由于出现早熟终止密码子，导致截短的转动体在内质网的错误定位且失活。广义的聚糖岩藻糖基化缺陷是因为高尔基体中作用于糖蛋白或糖脂的岩藻糖基转移酶不能接近和进入其供体底物引发的。LAD-Ⅱ型综合征的嗜中性粒细胞不能迁移和细菌感染增强，完全可以由选凝素缺少岩藻糖基化配体解释清楚。与其相比，LAD-Ⅱ发育缺陷的基础分子机制还是未知数，但是这种发育缺陷的原由可能与发育过程细胞间相互作用聚糖上末端岩藻糖残基的作用有关。由于在这些个体中这种不易发现的缺陷是因为蛋白质糖基化作用出现了问题，也有人建议把这种病称为先天性糖基化Ⅱc型缺陷（参见第14章）。

大剂量口服岩藻糖治疗LAD-Ⅱ患者，能成功地治愈患者的免疫缺陷，对一位儿童患者也有疗效，缓解了他严重的神经性缺陷。包括对选凝素的配体在内，细胞表面聚糖的岩藻糖基化作用也得到了恢复，嗜中性粒细胞也能迁移到感染部位。但是，另外两位糖基化缺陷患者用岩藻糖治疗，对糖基化作用无效。第4位患者口服治疗，产生了岩藻糖基化的聚糖，但遗憾的是，在这位患者血液中出现了抗体识别的合成H抗原，产生了自免疫应答。高剂量口服岩藻糖增加了胞质中GDP-岩藻糖的合成数量，但是还不知道回应治疗的这两位患者的GDP-岩藻糖是如何运送到高尔基体的，想必另有输送GDP-岩藻糖的途径。已经证实果蝇中存在定位于内质网的第2个GDP-岩藻糖转运体，但在哺乳动物中尚未发现同源物的报道。

论述题

• 论述为什么对LAD-Ⅱ的分析能提高我们对聚糖岩藻糖基化分子机制的了解，并提出含岩藻糖聚糖在细胞识别事件中作用的证据。

主要文献

• Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, M.L., Paulson, J.C., and Gershoni-Baruch, R.(1992). Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency, *New England Journal of Medicine* **327**, 1789-1792.

• Helmus, Y., Denecke, J., Yakubenia, S., Robinson, P., Luhn, K., Watson, D.L., McGrogan, P.J., Vestweber, D., Marquardt, T., and Wild, M.K.(2006). Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter, *Blood* **107**, 3959-3966.

• Lübke, T., Marquardt, T., Etzioni, A. Hartmann, E., von Figura, K., and Körner, C.(2001). Complementation cloning identifies CDG-II c, a new type of congenital disorder of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency, *Nature Genetics* **28**, 73-76.

• Lühn, K., Wild, M.K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., and Vestweber, D(2001). The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter, *Nature Genetics* **28**, 69-72.

5.6 聚糖生物合成途径的时空组织需要复合的细胞装置

聚糖增长链上糖的添加顺序取决于酶的底物专一性和底物在分泌途径迁移过程中先后抵达的顺序。因此，真核生物细胞内的这一装置的组织，对决定形成哪种聚糖具有重要作用。通过用识别特异中间聚糖的凝集素和用生物合成酶的抗体染色细胞，可以鉴定生物合成不同步骤中的位点。例如，启动黏蛋白型O-连接聚糖的GalNAc转移酶染色定位于高尔基体，这也是识别与丝氨酸或苏氨酸残基连接的GalNAc特异性凝集素的染色部位（图5.7）。高尔基体内N-连接和O-连接糖在生物合成途径中酶的作用顺序，表明了它们在高尔基体叠层中所处的位置：甘露糖苷酶Ⅰ，出现在顺面高尔基体；建构分支结构的GlcNAc转移酶位于高尔基体中间层；添加半乳糖和唾液酸末端残基的酶，位于反面高尔基体。

由于高尔基体在糖缀合物生物合成中的重要作用，我们对这一细胞器的认识进展，平行于对聚糖生物合成酶进行的研究。在胞质尾区、穿膜结构域、茎柄区和催化域各处发现不同的糖基转移酶定位信号，但这些信号如何作用有多种解释（图5.8）。一种可能是由于从内质网经高尔基体到质膜双层厚度梯度的增加，决定糖基转移酶最适宜位置的是穿膜结构域的

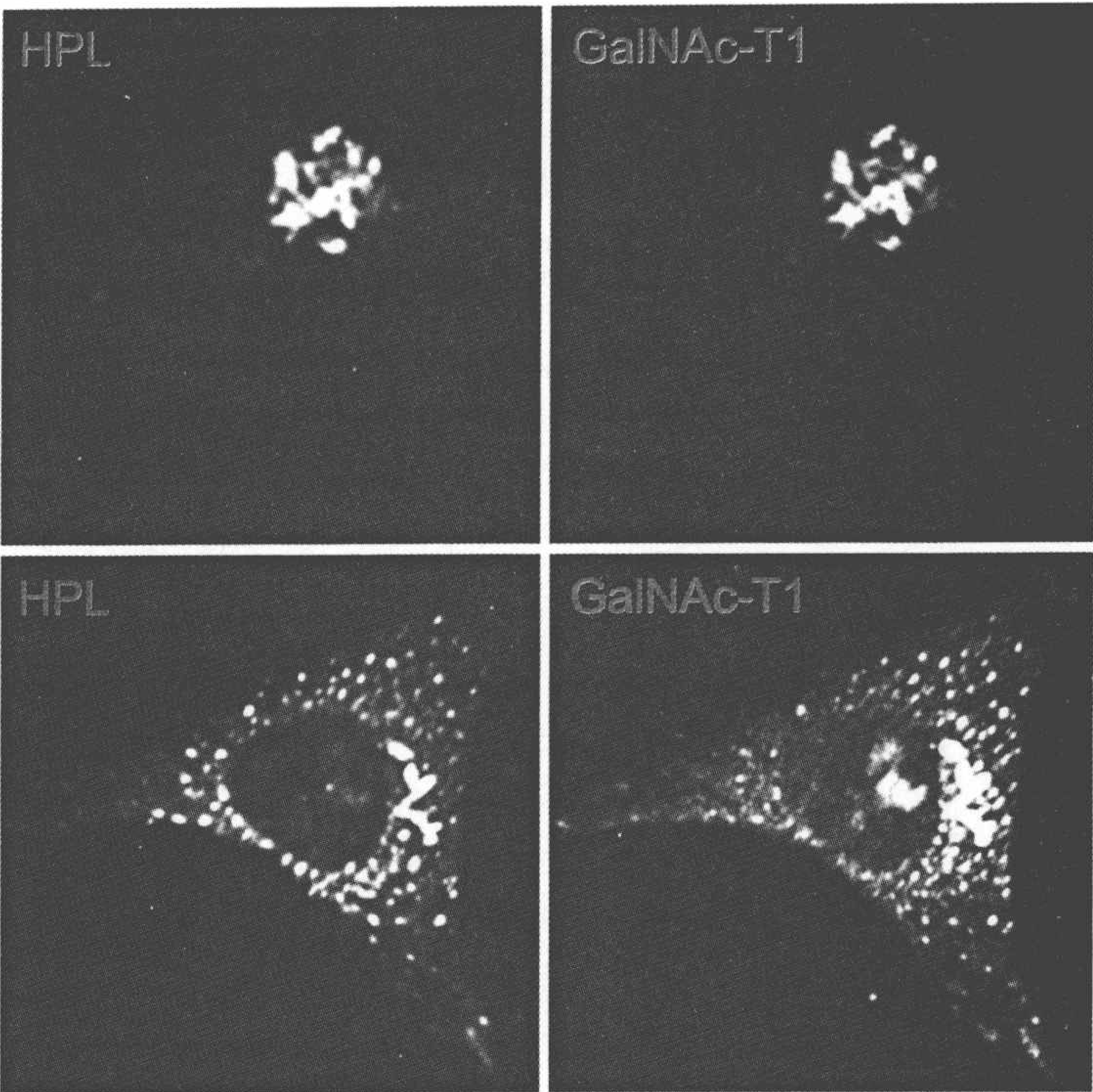


图 5.7 荧光显微镜观察下的糖基转移酶的定位及其细胞中的产物连接丝氨酸和苏氨酸残基的 GalNAc[用罗曼蜗牛（Snail Helix Pomatia）凝集素 HPL 染色] 与启动黏蛋白型 O- 连接聚糖 GalNAc 转移酶之一（用抗体染色）的共定位。上图：在未处理海拉细胞高尔基体中发现的酶及其产物。下图：用表皮生长因子处理后，在内质网中出现的酶和产物（经允许，从 Gill,D.J., Chia, J., Senewiratne, J., and Bard, F. (2010) Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes,Journal of Cell Biology **189**, 843-858 复制）

长度。如果把高尔基体看作是底物通过的静止细胞器，酶的一种重要特性可能是运输小泡对酶的排斥作用，这种小泡负责从高尔基体一层扁囊运输底物至下一层。这种排斥作用可能是因形成大型酶复合物引起的。另外，在高尔基体潴泡移行模型中，为了拣回和逆向运输流失的酶，酶必定被分拣到运输小泡；糖基转移酶可能通过与胞质尾区相互作用的衔接分子结合。酶的定位变化也可能改变糖基化的格局。例如，用生长因子刺激细胞导致 GalNAc- 转移酶从高尔基体向内质网移动（图 5.7）。同样在肿瘤细胞中的这种变化，可能与这些细胞中糖基化的改变有关。

➲有关糖基化工程参见 13.7 节。

除了酶在分泌途径特定部分定位外，复合体中糖基转移酶的局部组装，可能促成糖蛋白成熟过程中酶反应步骤特定顺序的建立。GlcNAc- 转

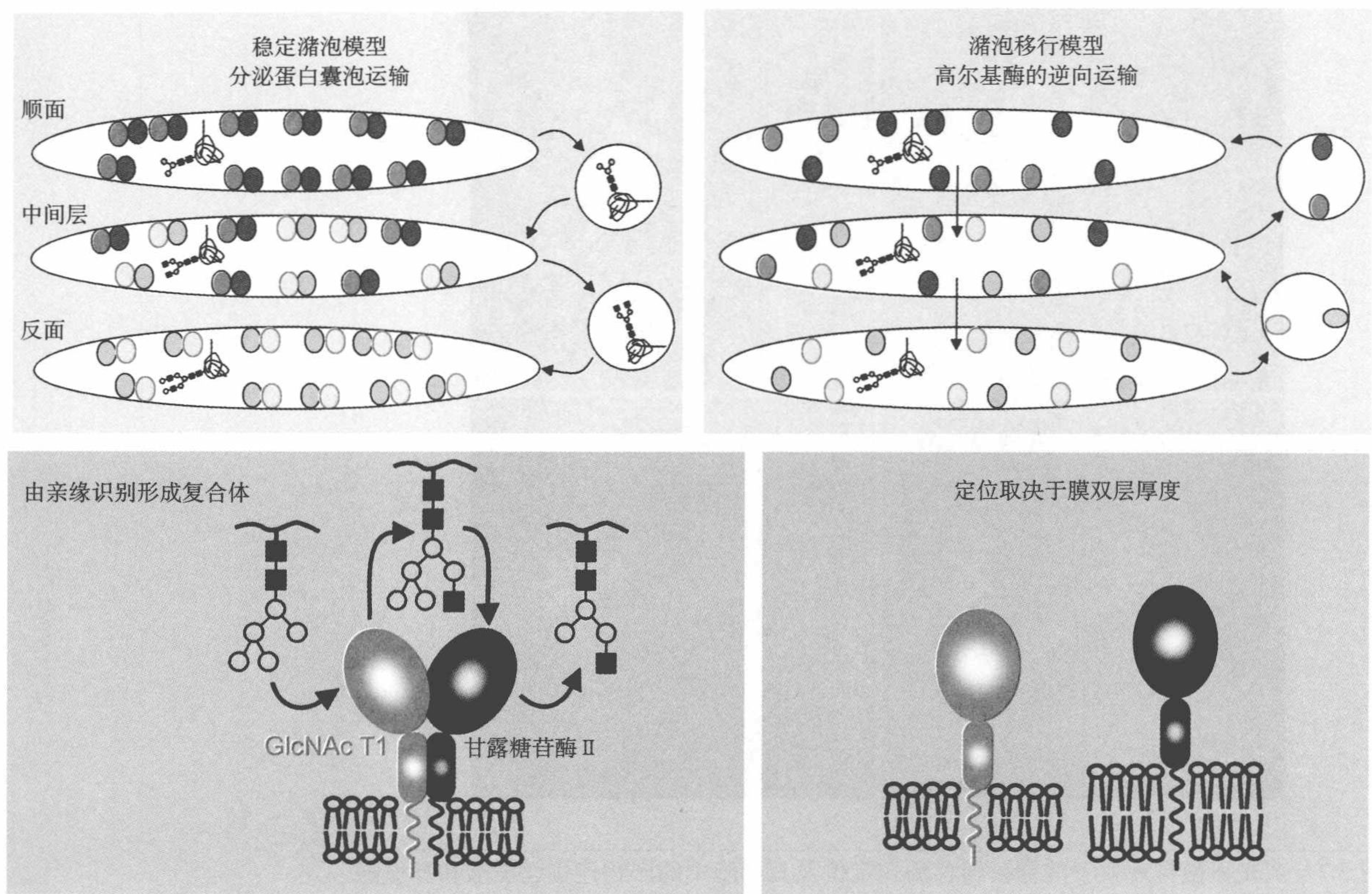


图 5.8 分泌途径中控制糖基转移酶在特定位点定位的机制。在静止高尔基体内糖基转移酶的移动可能受复合体形成的限制。如果因潴泡移行引发底物移动，胞质域中识别保留信号的衔接物可能介导糖基转移酶的逆向运输。穿膜域的长度与沿途径增长的脂双层厚度相匹配是确定糖基转移酶保留位点的假设机制

移酶 I 和甘露糖苷酶 II 是两个彼此相关的酶，当 N- 连接聚糖从高甘露糖型加工为复合型糖时，GlcNAc- 转移酶 I 催化添加第一个 GlcNAc，而甘露糖苷酶 II 则连续催化两甘露糖残基的清除反应。在被称为亲缘识别（kin recognition）过程中，这两种酶的颈结构域（neck domain）在膜腔内侧缔合。其他一些彼此相互作用的酶还有在多乳糖胺链形成过程中，相继起作用的半乳糖基转移酶和 GlcNAc 转移酶及一些参与糖胺聚糖链生物合成和修饰作用的酶。这些相互之间有关联的酶，既保证了两步酶促反应进行到底，即两步反应间的中间体不会提前释放和逃逸，还能促进酶的序贯反应活性，使酶多轮次地催化添加和修饰反应。

5.7 突变细胞系可作为研究糖基化并阐明 N- 连接糖基化重要性的工具

科学家曾通过化学和辐射诱变处理产生糖基化装置变异的中国仓鼠卵巢细胞。由于这种仓鼠细胞是二倍体，具有稳定的遗传性和染色体数目低（$2n=22$）的优点，对研究有利。用毒性植物凝集素、细菌毒素或糖抗体选择是创建糖基化突变体的关键性步骤。用过的选择剂包括菜豆凝集素（一种从菜豆中分离，结合半乳糖末端二天线复合聚糖的植物凝集素）和蓖麻毒蛋白凝集素（一种从蓖麻籽中分离，可与任何末端为 β1-4 连接的半乳糖残基的聚糖结合的凝集素）。

选用这些毒素，可使一些形成末端半乳糖聚糖的不同糖基化步骤中的突变细胞系产生缺陷。有些情况下，这种变化只特异性地对载有半乳糖的聚糖产生影响，但另外情况下，则广泛地对各类聚糖都有影响（图 5.9）。这种策略曾在糖基转移酶基因、加工糖苷酶和核苷酸糖运输，以及核苷酸糖生物合成突变中用于产生抗凝集素细胞系。例如，由于 GlcNAc-T1 基因变异，Lec1 细胞只限于表达高甘露糖型 N- 连接聚糖，而且由于 CMP- 唾液酸转运体失活，Lec2 细胞中所有糖蛋白和糖脂的聚糖都缺失唾液酸。

有缺陷的糖基化细胞系有助于界定聚糖生物合成途径，并且可以用作克隆实验基因转移的接受者，也可以作为生产糖基化修饰糖蛋白的工具。这种

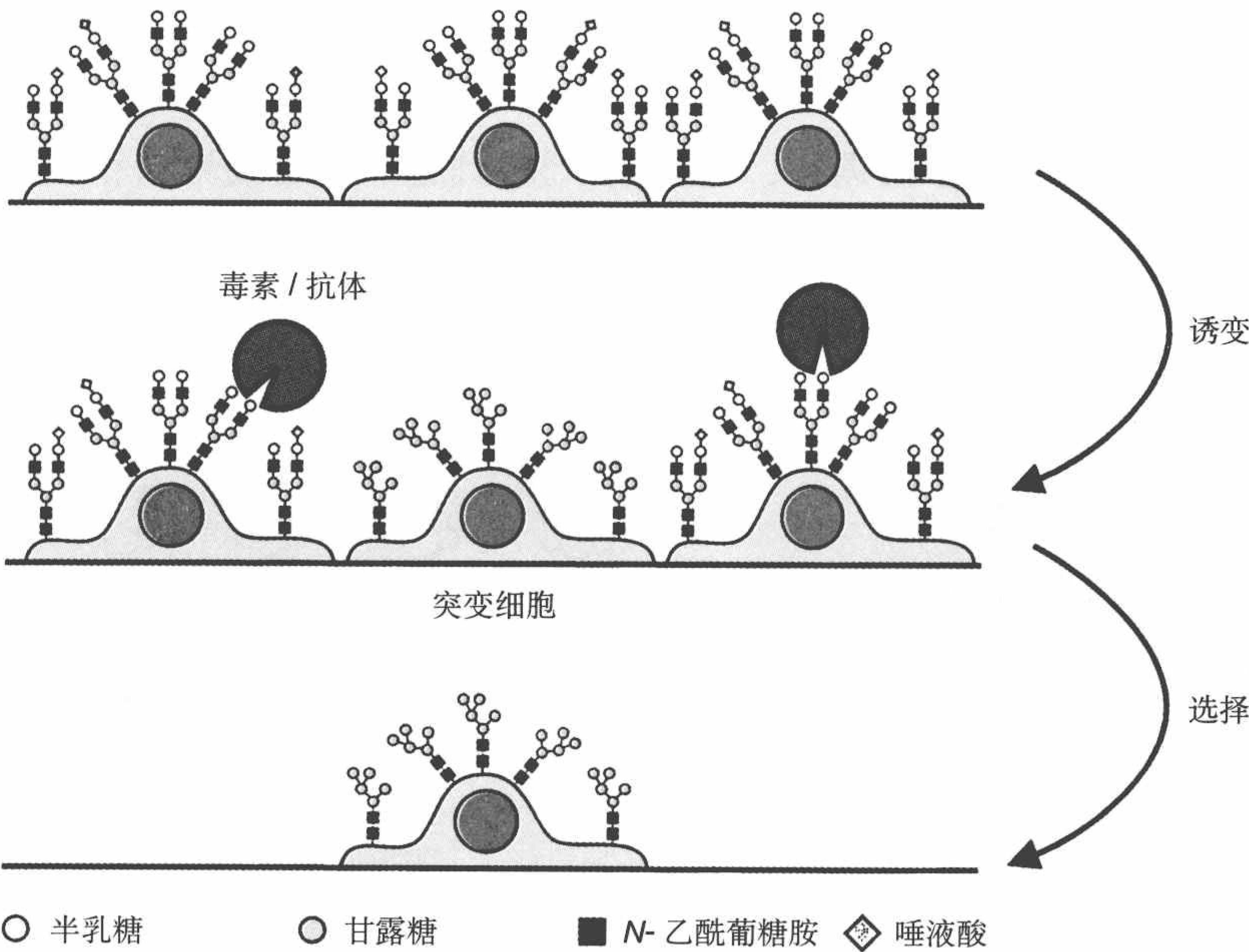


图 5.9 在中国仓鼠卵巢细胞中筛选异常糖基化的细胞。例如，诱变之后，可用蓖麻毒蛋白毒素筛选不能在聚糖上连接半乳糖的细胞，因为毒素靶向末端半乳糖残基并杀死细胞

◐有关糖基化工程参见 13.5 节。

◐有关糖蛋白导向参见 10.7~10.9 节。

糖基化工程（glycosylation engineering）在糖蛋白治疗药物生产领域具有特别重要的意义。由于糖蛋白上聚糖结构常是其在生物体中趋靶和代谢更新的决定因素，为了能将糖蛋白输送到正确无误的细胞，或者为了保证它们在循环系统有相当长的半衰期，生产特殊类型的糖基化糖蛋白非常重要。

突变细胞系在界定细胞不同类型糖基化功能方面也很重要。例如，在 Lec1 细胞上的 N- 连接聚糖，全部只限于高甘露糖型，Lec1 细胞的生存直接证明细胞生存不需要复合聚糖。但是，N- 连接糖基化不能因不需要而完全免除。通过培育敲除 GlcNAc-1- 磷酸转移酶（一种为 N- 连接聚糖合成多萜醇连接前体，形成 UDP-GlcNAc 供体所需的酶）的杂合小鼠，并进行小鼠的杂合育种，可获得缺失全部 N- 连接糖基化的突变细胞。该酶的纯合突变体胚胎细胞不能生存的事实，表明细胞基础功能还有赖于 N- 连接糖基化。

5.8 敲除小鼠为糖基化在哺乳动物生物学中所起作用提供了大量证据

生物体的糖基化重要作用大多是在诱变策略延伸至敲除小鼠的基础上得出结论 (图 5.10)。一项重要发现表明缺失 GlcNAc- 转移酶 I 的小鼠，在胚胎期 8.5d 后死亡。因此，与在细胞中的情况对比，生物体的发育需要复合聚糖。

同类研究表明细胞中的糖脂、糖脂锚、黏蛋白型 O- 连接聚糖和蛋白聚糖可以完全缺失，但在生物体中这些糖不能全部缺失。为防止葡糖神经

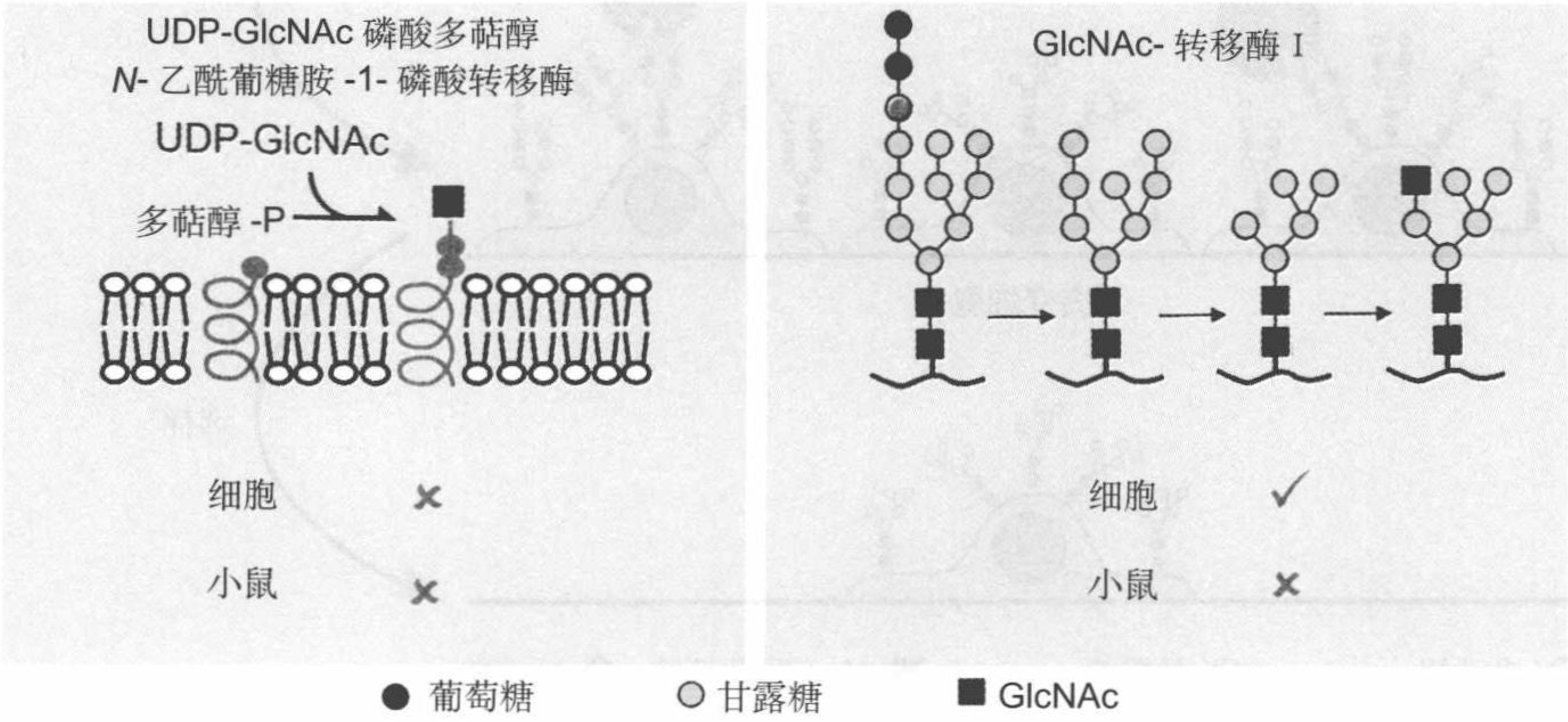


图 5.10 细胞和生物中消除各类 N- 连接聚糖的效果对比。细胞实验表明，细胞存活需要 N- 连接聚糖。但是，加工成复合型结构并非必需。与之相反，生产存活的小鼠，则需要复合型聚糖

鞘脂类的形成，敲除脑酰胺葡糖基转移酶基因，导致生物在原肠胚形成期死亡。敲除 PIG-A 基因造成蛋白质上缺失糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚的小鼠在胚胎发生早期死亡。由于卵子中可能存在由母体提供的酶活性，在胚胎发生早期的各阶段能够合成足够数量的聚糖，发育期需求 N- 连接聚糖的起始时间可能早于基因敲除所致的胚胎发育终止时间。为 GalNAc 结合丝氨酸和苏氨酸残基，启动合成黏蛋白型 O- 连接聚糖而存在的多个基因，使消除全部此类聚糖的实验很难进行。但是，消除修饰 GalNAc 的半乳糖基转移酶则是致死性的。看起来，虽然在胚胎早期发育各阶段，各类糖缀合物都是必要的，但是，在任何情况下，对聚糖为何是不可缺少的尚未确切地了解。

➲更多关于 GPI 锚参见 4.9 节。

与删除某一整类聚糖导致发育早期致死相比，在同样结构上添加精细末端的酶对小鼠的存活并不是必不可少的。在细胞和敲除小鼠联合研究中发现，缺失一组特异聚糖后的表型，随受累聚糖组变小，逐渐变得越来越轻微（图 5.11）。由此得知，完全消除细胞中的 N- 连接聚糖是致命的，

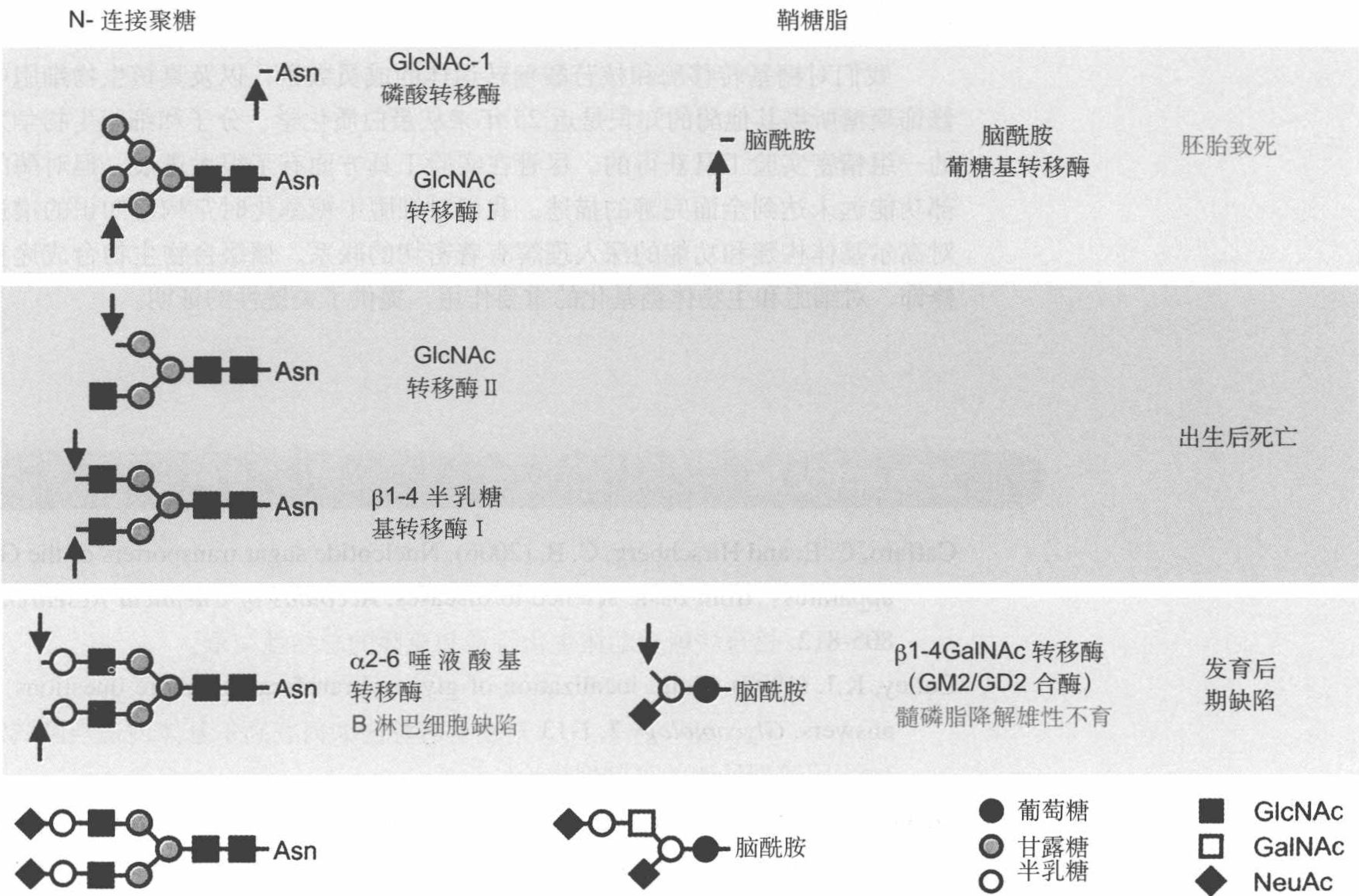


图 5.11 糖缀合物生物合成不同阶段的突变影响。N- 连接聚糖和鞘糖脂生物合成途径中的突变表明，全部消除糖缀合物常使胚胎发育致死，然而，末端修饰作用的中断，不影响小鼠生存，但倾向于选择性地影响某些细胞群体的性状

在生物体中，完全消除复合体N-连接聚糖是致死的，但对细胞则不能致死。生物体中只产生部分加工的N-连接聚糖，导致小鼠出生后在有限时期内存活。消除末端为2-6连接唾液酸的特异N-连接聚糖，只影响一类细胞——B淋巴细胞。同样情况，只敲除糖脂GM2和GD2，主要只对很小的细胞亚群产生影响，并导致髓磷脂降解和精子发育出现问题。多个糖基转移酶都可以为多数末端糖合成相同或类似的连键，作为缺失酶的弥补。但是，应该强调指出的是，多数这种敲除小鼠都有组织特异性和阶段特异性缺陷，表明在特定发育阶段，特定的聚糖有其重要作用。虽然在本书其他章节中已有介绍，但聚糖多数必要的功能，还有待进一步的探索。一般说来，对单个组织发育后期聚糖作用的分子基础开展研究更易于进行，因为生化分析将更加可行。

小　结

我们对糖基转移酶和核苷酸糖转运体的成员数目，以及真核生物细胞中为修饰聚糖所需其他酶的知识是近25年来从蛋白质化学、分子和细胞生物学发展的一组精密实验工具获得的。尽管在实验工具方面有了很大进展，但对酶的全部功能远未达到全面完善的描述。我们对细胞中糖基化时空构建知识的增进与对高尔基体构建和功能的深入理解有着密切的联系。糖缀合物生物合成途径的修饰，对细胞和生物体糖基化的重要作用，提供了关键性的证明。

主要参考文献

Caffaro, C. E. and Hirschberg, C. B. (2006). Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus：from basic science to diseases, *Accounts of Chemical Research* **39**, 805-812. 核苷酸糖转动体生化特征和克隆的总结性文章。

Colley, K.J. (1997). Golgi localization of glycosyltransferases：more questions than answers, *Glycobiology* **7**, 1-13 对糖基转移酶如何在高尔基体内适当区域定位的不同模型证明的评判性评论。

De Graffenried, C. L. and Bertozzi, C. R. (2004). The rotes of enzyme localization and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus, *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 356-363. 关于高尔基体内定居和非定居蛋白质如何分捡等不同理论的最新观点。

Ernst, L. K. , Rajan, V P. , Larson, R. D. , Ruff,M. M. , and Lowe, J. B. (1989). Stable expression of blood group H determinants and GDP-L-fucose：β-D-galactoside

2-α-L-fucosyltransferase in mouse cells after transfection with human DNA, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3436-3447. 文章描述了糖基转移酶表达克隆中的关键步骤。

Gordon. R. D, Sivarajah, S. , Satkunarajah, M. , Ma, D. , Tading, c. A. , Vizitiua, D. , Withers, S. G, and Rini, J. M. (2006). X-ray crystal structures of rabbit *N*-acetylglycosaminyttransferase I(GnTI)in complex with donor substrate analogues, *Journal of Molecular Biology* **360**, 67-79. 含有 DXD 模体的糖基转移酶的实例，表明构象变化与供体底物结合相关。

Kikuchi N. and Narimatsu H. (2006)Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyitransferases, *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**, 578-583. 文章讨论序列模体如何用于鉴定人基因组中的糖基转移酶。

Lowe. J. B. and Marth, J. D. (2003). A genetic approach to mammalian glycan function, *Annual Review of Biochemistry* **72**, 643-691. 在组织完好和评判性评论中，总结出在聚糖生物合成途径中创建的大多数敲除小鼠。

Patenaude, S. I., Seto, N. O. L. ,Borisova, S. N. , Szpacenko, A. , Marcus, S. L., Palcic, M. M. , and Evans, S. V (2002). The structural basis for specificity in human ABO(H)blood group synthesis, *Nature Structure Biology* **9**, 685-690. 在 A 和 B 转移酶中结合位点的比较，表明在改变供体底物特异性上有微小的差别。

Ramakrishnan, B, and Qasba, RK. (2001). Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformationai change in its catalytic component, the β1-4-galactosyltransferase-l, *Journal of Molecular Biology* **310**, 205-218. 描述乳糖合成酶和半乳糖基转移酶之间的关系。

Rao, F. V. Rich, J. R., Rakić. B., Buddai, S., Schwartz, M. F. , Johnson, K. , Bowe, C., Wakarchuk, W. W., DeFrees, S., Withers, S. G., and Strynadka, N. C.J. (2009). Structural insights into mammalian sialyitransferases, *Nature Structural and Molecular Biology* **16**, 1186-1188. 哺乳动物唾液酶基转移酶的结构说明保守的唾液酸模体的作用。

Stanley, P. and loffe, E. (1995), Glycosyttransferase mutants：key new insights in glycobiology, *FASEB Journaf* **9**. 1436-1444. 对来自糖基化突变体洞察力，特别对产生于中国仓鼠卵巢细胞的糖基化突变体分析的总结。

习 题

5.1 讨论为什么对细胞中糖基化装置在分子水平的认识直到 20 世纪末才得到发展。

5.2 蛋白聚糖生物合成起始步骤需要的 UDP- 木糖酶存在于高尔基体腔内，因此，似乎不需要 UDP- 木糖转运体。论述为什么需要这种转运体，并提出确实存

在这种转运体的证据。

参考文献: Bakker, H., Oka, T., Ashikov, A., Yadav, A., Berger, M., Rana, N.A., Bai, X., Jigami, Y., Haltiwanger, R.S., Esko, J.D., and Gerardy-Schahn, R.(2009).Functional UDPxylose transport across the endoplasmic reticulum/Golgi membrane in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in UDP-xylose synthetase, *Journal of Biological Chemistry* **284**, 2576-2583

5.3 由于糖基转移酶序列之间相似性低，以比较全部序列同一性的方法，在基因组中找出新转移酶不是很有效。描述另一种以短序列共有模体作为依据，即基于轮廓勾画的策略，是更为有效的方法。

参考文献：Narimatsu, H.(2006). Human glycogene cloning: focus on β3-glycosyltrans-ferase and β4-glycosyltransferase families, *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 567-575.

5.4 了解高尔基体内糖基转移酶如何保持在正确位置的难点之一是缺乏能包被一特异性衔接蛋白识别的传统保留信号。讨论在这些酶中可能存在新型信号的最新证据。

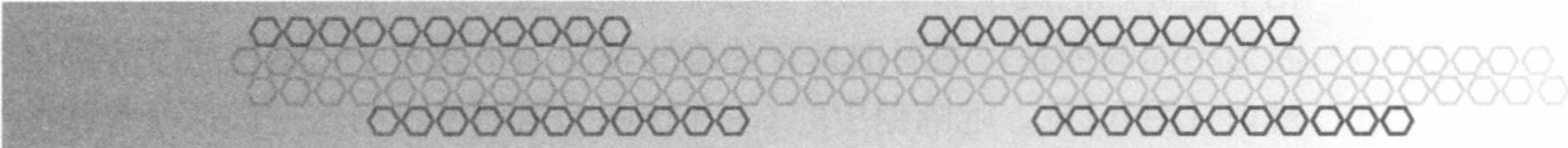
参考文献：Tu, L.T., Tai, W.C.S., Chen, L., and Bandfield, D.K.(2008). Signalmediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi, *Science* **321**, 404-407.

5.5 讨论为什么氨基酸残基的突变转换能将血型 A 转移酶转化为血型 B 转移酶，但不能进行反向突变转换实验。

5.6 通过对植物凝集素特异性和相关细胞系缺陷的研究，解释：（a）为什么 Lec1 细胞对蓖麻毒蛋白、植物凝集素和扁豆凝集素（Lens culinaris）具有抗力，但是用伴刀豆球蛋白 A 处理比对野生性细胞更为敏感；（b）为什么 Lec2 细胞保持对蓖麻毒蛋白敏感的同时，对麦胚凝集素具有抗力？

糖组学和聚糖结构分析

6



学习目的

学习本章后应知内容：

1. 利用磁共振、质谱、色谱法和糖苷酶鉴定聚糖结构
2. 糖组学概念和如何积累细胞和组织的聚糖组成数据，并可以数据库获取
3. 合成聚糖的制备方法及其用途

细胞或生物体中聚糖的全体成员总称为糖组（glycome）。随每个糖基转移酶在细胞类型之间和不同发育阶段表达的变化，细胞糖组也有变化。因此，与蛋白质组一样，糖组也是特定细胞类型和特异分化状态下的一种特性。可以说基因组规定了生物体，而蛋白质组和糖组则规定了细胞。另外，像ABO血型多态化一样，个体间的糖基化作用也出现变异，而且某些变异与疾病状态有关。由此，糖组分析奠定了对细胞分化和疾病中糖组功能认识的基础。另外，为了确立特定糖蛋白和糖脂上的聚糖具有受体结合靶标的作用，也需要进行聚糖分析。与蛋白质和核酸测序相比，分析糖蛋白和糖脂上连接的聚糖的共价结构（聚糖测序）是一件让人望而生畏的任务。其中的两个难点在于聚糖结构的分支特性及其广泛的不均一性，意味着建构在糖蛋白上的聚糖不是单一的结构。在这一章里对聚糖测定和寡糖合成常用方法的优势和局限性提出了一些简明扼要的评论。

6.1　核磁共振法提供寡糖可靠的结构信息

已用核磁共振（NMR）法测定了大量寡糖结构。NMR分析寡糖比质谱法和色谱法（这些方法将在下面几节中讨论）分析所需的物料多，而且NMR不太适合分析混合物。但是它可以提供其他方法不能得到的信息，还可以作为聚糖结构的最终信息源。

在界定从质谱法观察到的断裂图式和界定作为其他方法的支撑技术的糖苷酶活性时，这方面的信息知识非常重要。虽然NMR特别适合研究高

浓度下溶解的小分子寡糖，但是因为许多质子处于相似的环境，很难解释糖的 NMR 谱。例如，吡喃糖形式半乳糖上的 C2、C3、C4、C5、C6 都连接一个氧原子，这些碳上的质子都处于非常相似的环境，因此有着相似的化学位移。但是相邻碳上质子的排列配置强烈地影响质子间的偶联，而且因为不同的糖在环的周围具有独特的轴向和平面质子，这些质子容易区别辨识（图 6.1）。吡喃糖中的 C1 连接两个氧原子，与这一碳原子连接的异头质子所处环境不同，容易和其他质子区别开来，这一质子的化学位移，及其与 C2 上质子偶联，在 α 和 β 两种异头物之间均有不同，因此 NMR 谱可以对糖间连键的立体化学提供关键性信息。经过合适的调整，NMR 还可以提供多糖和低分子质量寡糖的重复连键信息。

6.2 糖苷酶用于分析聚糖结构

目前有许多方法至少可以用于确定较常见类型的、与蛋白质和脂质相连的聚糖共价结构。用无水肼处理或通过肽 -*N*- 聚糖酶（peptide *N*-glycanase，PNGase）消化，可以从多肽释放 N- 连接聚糖（图 6.2）。同样方法，用强碱和用葡糖脑酰胺酶分别处理多肽，可以释放 O- 连接聚糖和葡糖基脑酰胺的头部基团。释放后的聚糖集合体可以分离为单一成分。用已知专一性的糖苷酶，通过从非还原端顺序降解，可以分析各单一聚糖的结构。这种酶法处理的效果，可以通过色谱分析法监控消化产物。消化过程之后，用荧光染料标记寡糖还原端（图 6.2）。释放的单糖可以忽略，因为只有含标记物的还原端片段才能被检测到，故此标记的出现可作为内设的参照点。消化后，根据单糖在寡糖色谱变化中的已知作用，把洗脱位置的变化与清除确切数目的单糖联系起来（图 6.3）。不能被特定的酶消化也可以提供重要信息。

例如，产脲节杆菌（*Arthrobacter ureafaciens*）的神经氨酸酶（唾液酸酶）可以释放 α2-3 或 α2-6 连键的唾液酸，而新城疫病毒（Newcastle disease virus）的神经氨酸酶则对 α2-6 连接的唾液酸不起作用。新城疫病毒的神经氨酸酶不能消化的寡糖， 能用产脲节杆菌的神经氨酸酶消化，表明半乳糖残基是由连接 α2-6 连键的末端唾液酸残基作为加帽。

顺序降解的基本方法有许多变通方式。考虑到某些核心成分在 N- 连接寡糖中是常见的，没有必要完全消化到还原端糖，因为核心结构的色谱性状，已经过充分地鉴定，完全可以从洗脱位置识别。事实上，很多情况下，

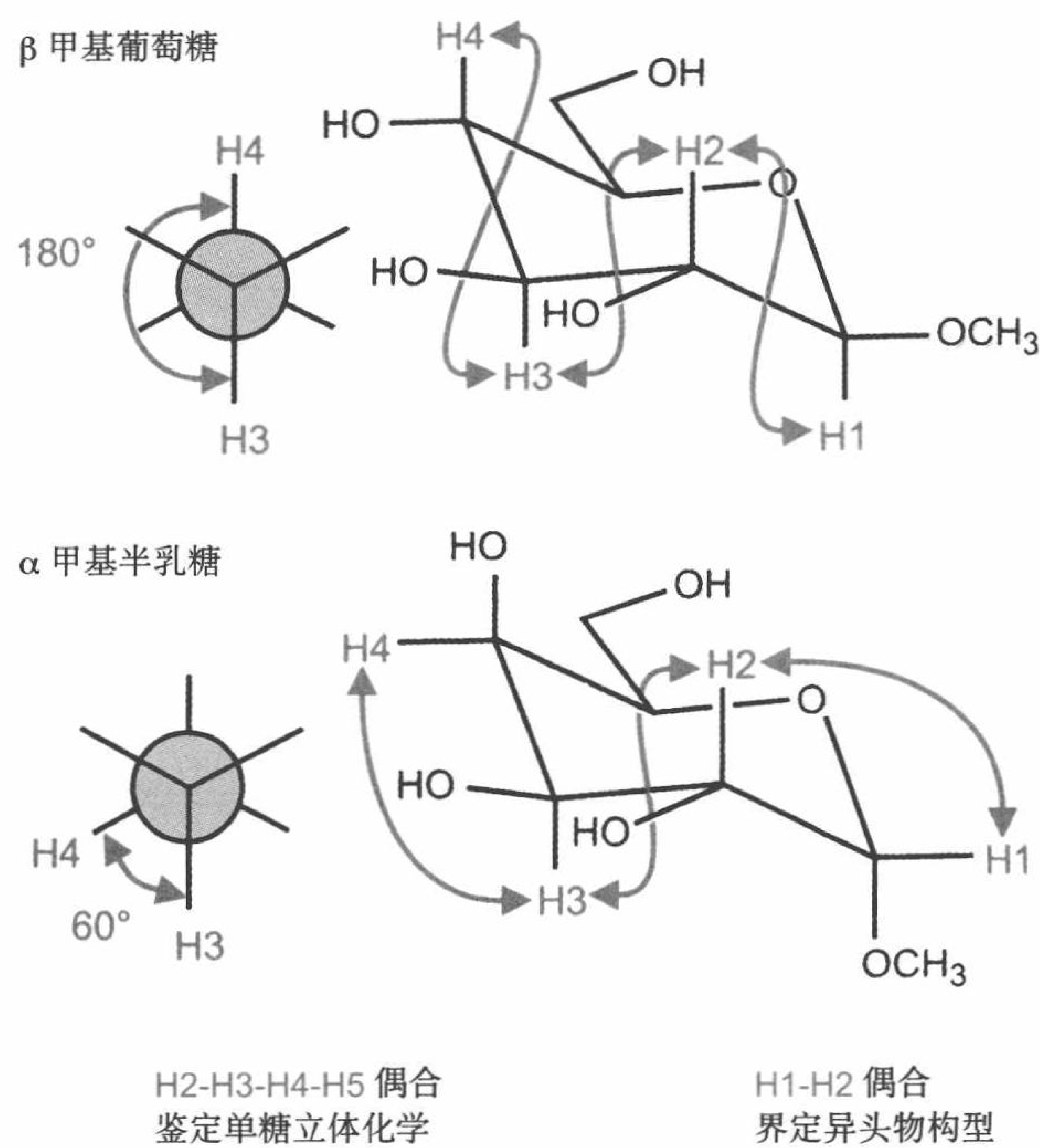


图 6.1 **NMR 法用于测定单糖和连键构型。**邻近碳原子上氢核（hydrogen nuclei）的相互作用取决于其相对方向。反式排列的氢（扭角 180°）出现强度偶合，氢以顺式排列时（扭角 60°），偶合强度变弱。偶合常数的强弱，可用于测定氢的特性，因此，可以确定每种单糖的特征性羟基的特性。同样，可以利用 H1 和 H2 质子的偶合，推断糖苷键的立体化学

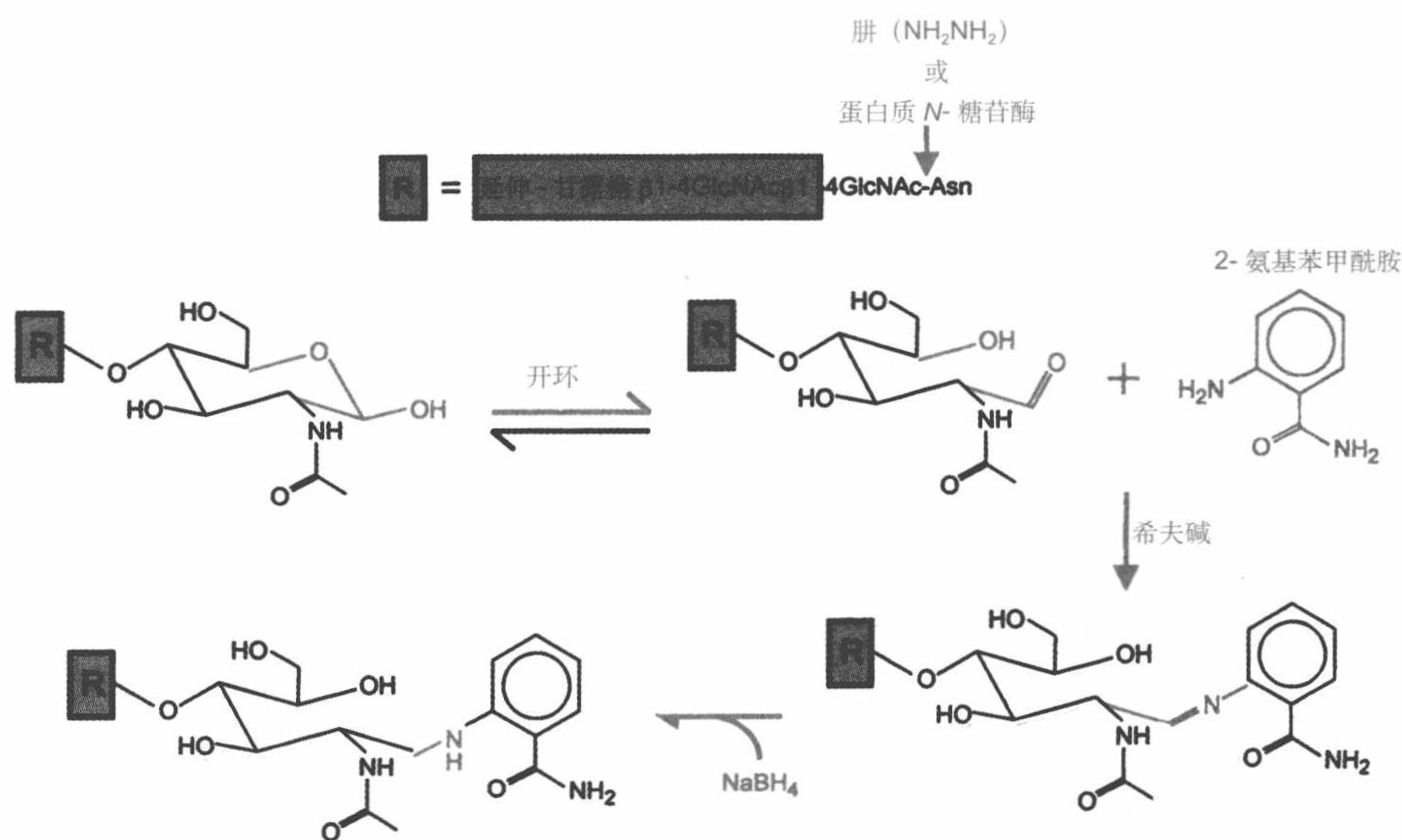


图 6.2 从蛋白质释放 N- 连接聚糖和用 2- 氨基苯甲酰胺荧光标签标记还原端。释放和标记的聚糖集合体采用色谱法分离为个体成分并测定其结构

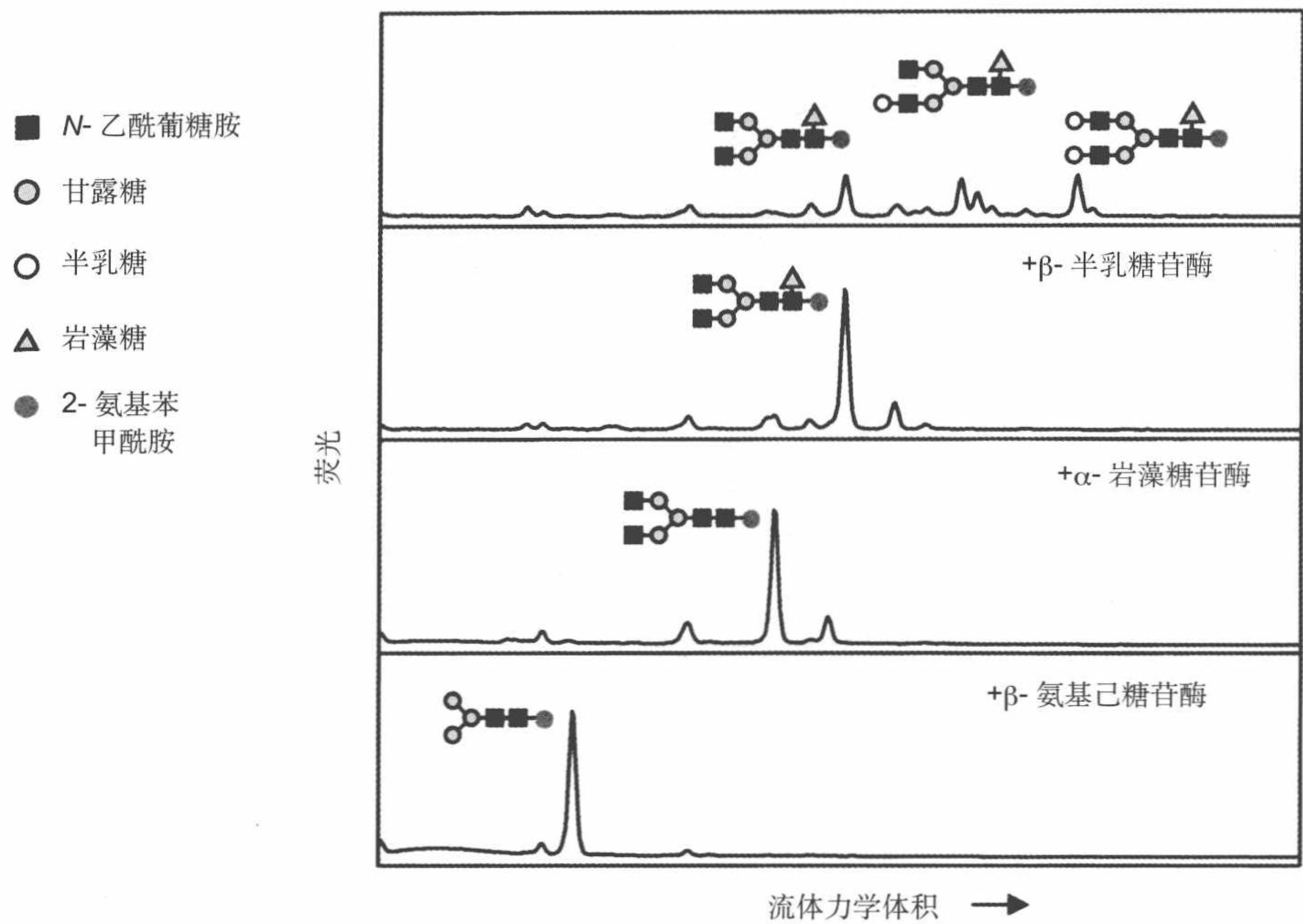


图 6.3 端部标记聚糖的酶法顺序消化。凝胶过滤阐明聚糖初始集合体由于末端唾液酸化和半乳糖基化程度不同呈不均一性。清除这些末端结构后，核心结构表现为单一物种性状。图中所示为 IgG 聚糖，为血清糖蛋白上所见二天线复合 N- 连接寡糖的典型实例 (数据来自牛津大学 Alison Critchley、Tony Merry 和 Dauline Rudd)

寡糖集合体的聚糖成分完全可以通过初始混合物的色谱图式，以合理的精确度推断出来。顺序消化还可以与放射性标记糖馈入细胞的内部标记法联合实施。例如，以 3H- 岩藻糖标记可以证明岩藻糖的存在。用对 *N*- 乙酰葡糖胺上的 α1-6 连接岩藻糖有特异作用的岩藻糖苷酶消化标记物，如果有放射性释放，便可以提供聚糖中的岩藻糖出现在何处的信息。

类似的方法还可以研究其他类型的糖基化，包括化学结构不同的蛋白聚糖的糖胺聚糖链。以硫酸乙酰肝素为例，在标记还原端糖之后，用亚硝酸进行初步有限度的化学裂解，可获得部分裂解的糖链，其中每个硫酸化葡糖胺残基均被切除，但不能切除未修饰的 GlcNAc 残基。在聚丙烯酰胺凝胶上测定产生的片段长度，可用于界定 *N*- 硫酸化作用的位点。用专一性硫酸酯酶和外切糖苷酶处理后，电泳条带发生移位，这可用于序列测定，即从酶消化后新暴露的非还原端开始，向内测定序列。

6.3 质谱法特别适用于分析含少量聚糖的复合混合物

质谱法既可以用于分辨聚糖混合物的成分，也可以作为获取聚糖结构信息的工具。剖析聚糖混合物是分析细胞和组织糖组的重要方法。

质谱法单独分析聚糖结构有几种方式。一种是用质谱法先测定聚糖完整的质量，获得聚糖的组成信息，因为只有数量有限单糖基本构件的组合与观察到的质量相符。另外，还可以直接在质谱仪中制备聚糖片段。片段间的质量差别，可提供关于聚糖序列的信息（图 6.4）。特性化的片段图式可以用来区分像甘露糖、半乳糖等质量相同的糖，可用于推断哪些羟基参与了连接连键。全甲基化（permethylation）与质谱法联合分析可以测定寡糖上哪些羟基参与了糖苷键连接（图 6.5）。

结构分析既可以分析纯化的聚糖，也可以分析混合物的个别成分。后一种情况下，在初始混合物分离后可通过串联质谱分析（MS/MS），直接进行片段化反应，重新分析获取结构信息。另外，作为灵敏的分析方法，质谱法

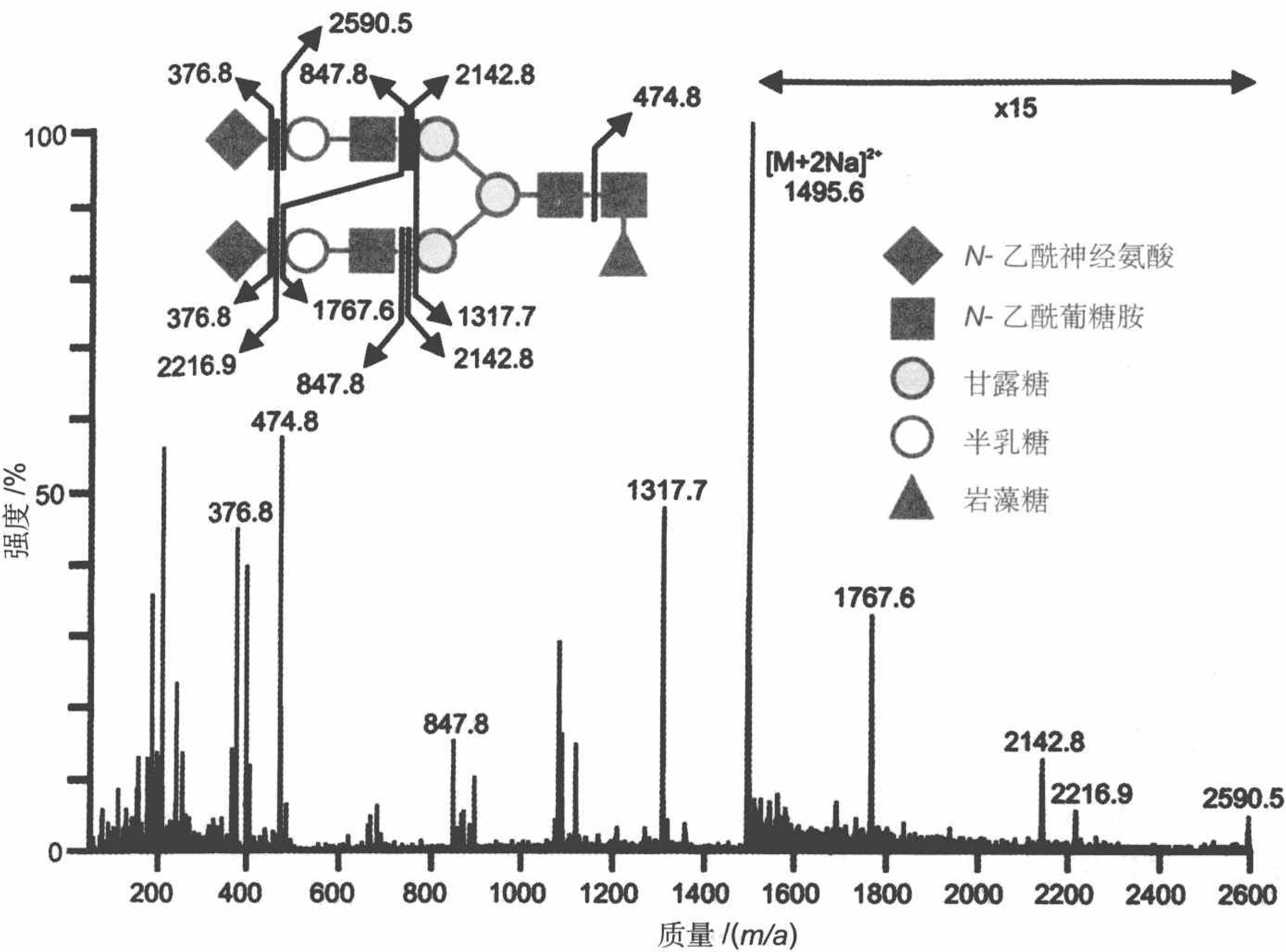


图 6.4 从质谱法观察到的聚糖片段化。在此例中，相对分子质量为 2590.5 的单个聚糖可用质谱法分离，并立即进行片段化，再用质谱法分析（MS/MS 分析）。这种片段化的空间格局，可用于推断结构各方面的情况（数据来自伦敦帝国学院 Simon North 和 Anee Dell）

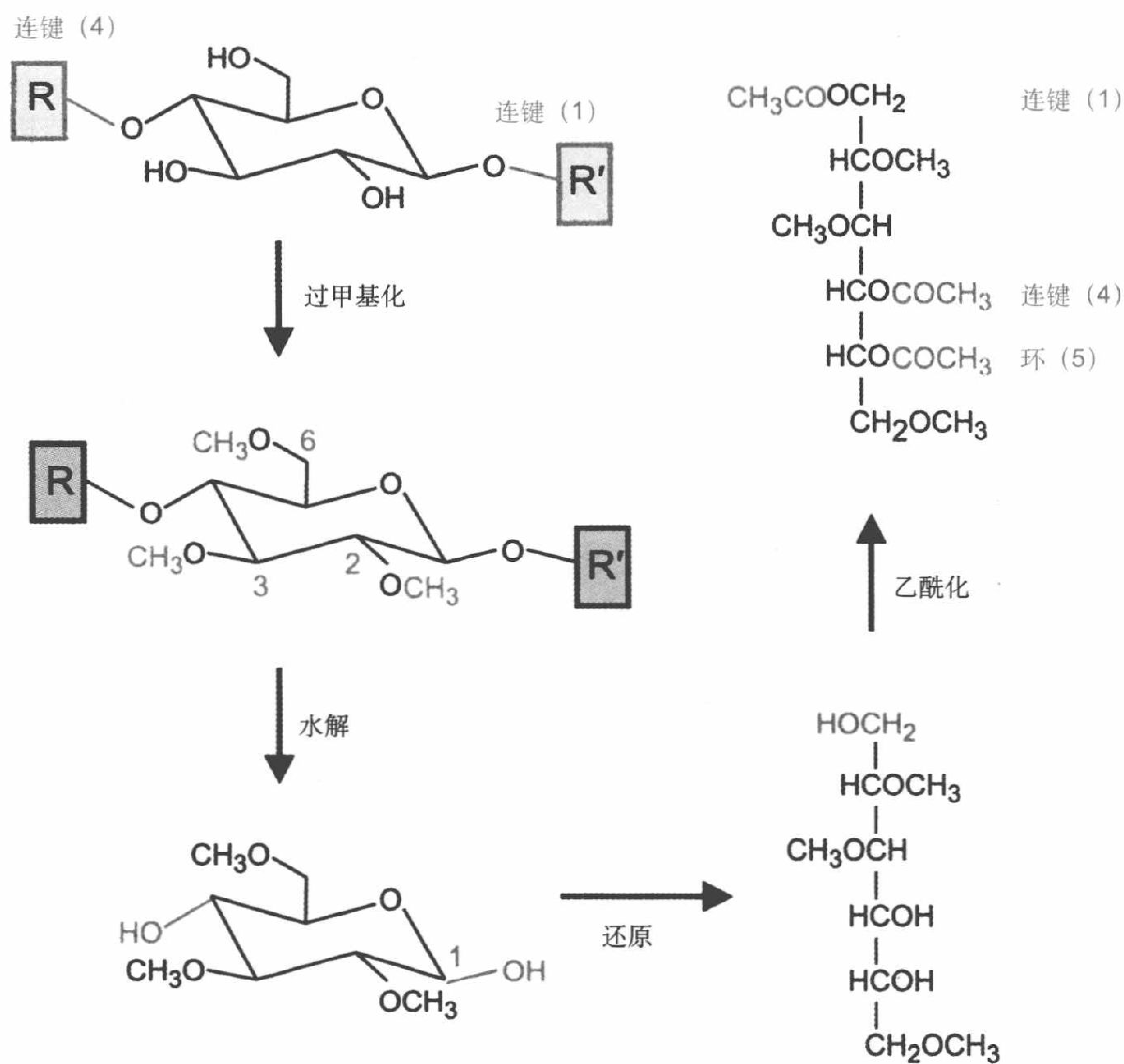


图 6.5 全甲基化法分析连键

在聚糖水解为成分单糖和还原成糖醇之前，整体聚糖中全部自由羟基进行全甲基化。通过糖苷键水解，打开环状结构，暴露的羟基被乙酰化。用色谱和质谱联合方法分析产生的挥发性糖衍生物混合物。各成分糖的片段空间格局可用于确定不同修饰的位置和连键。

还可以代替色谱法，在用酶法顺序降解后，分析非标记聚糖，所获结果的解读可参照前节所述酶消化层析图谱的方法。总之，质谱法对聚糖的非常规和非预期修饰的鉴定特别有用，包括像硫酸基团一类的非糖取代基。

单一蛋白质上有多个糖基化位点时，当聚糖从多肽链释放后，就会丢失有关聚糖结合位点的信息。与不同天冬酰胺残基结合的聚糖可能有很大区别。有些天冬酰胺只与高甘露糖型寡糖缀合，而同一蛋白质上另一些天冬酰胺可能与杂合或复合型结构缀合。通常采用位点分析（site analysis）建立这种信息，在位点分析中，先进行多肽的蛋白酶剪切，分离肽和糖肽，然后单独分析每一条多肽相关联的聚糖，从而确定各聚糖的位置分布。除此之外，质谱法还可以直接分析肽 - 糖肽混合物。

6.4 用糖组学阐明出现在细胞和组织中的聚糖，并用以研究结合聚糖的受体

目前正在研发一种与发育和疾病变化相关的糖组分析策略。质谱法特别适合于剖析，像 N- 连接、O- 连接完整的一类聚糖，或者在组织和特异细胞中连接糖脂的各种聚糖（图 6.6）。

质谱法的波谱根据观察到的重要单糖成分质量和各类聚糖生物合成途径两方面的组合信息进行阐释。这些阐释的信息现在可以大规模地以自动化方式获取。随采样和样品制备方法的改进，在不远的将来可能以高通量方式筛选千万个样品。虽然这样一种糖组特征谱不可能对每一个提议中的结构进行完全的界定，但可以对糖基化反应提供全面的看法。对某些指定结构含糊不清处，还可以在选取峰上继续用串联质谱分析方法进行分辨。

这种筛选方法的最初目的是用于测定个体之间糖组的变异程度，并追踪在细胞分化过程中糖基化的改变。同时也试图在糖基化差异与疾病，例如各类癌症之间建立相互关系。

➲有关糖基化工程参见 **13.7** 节和 **13.8** 节。

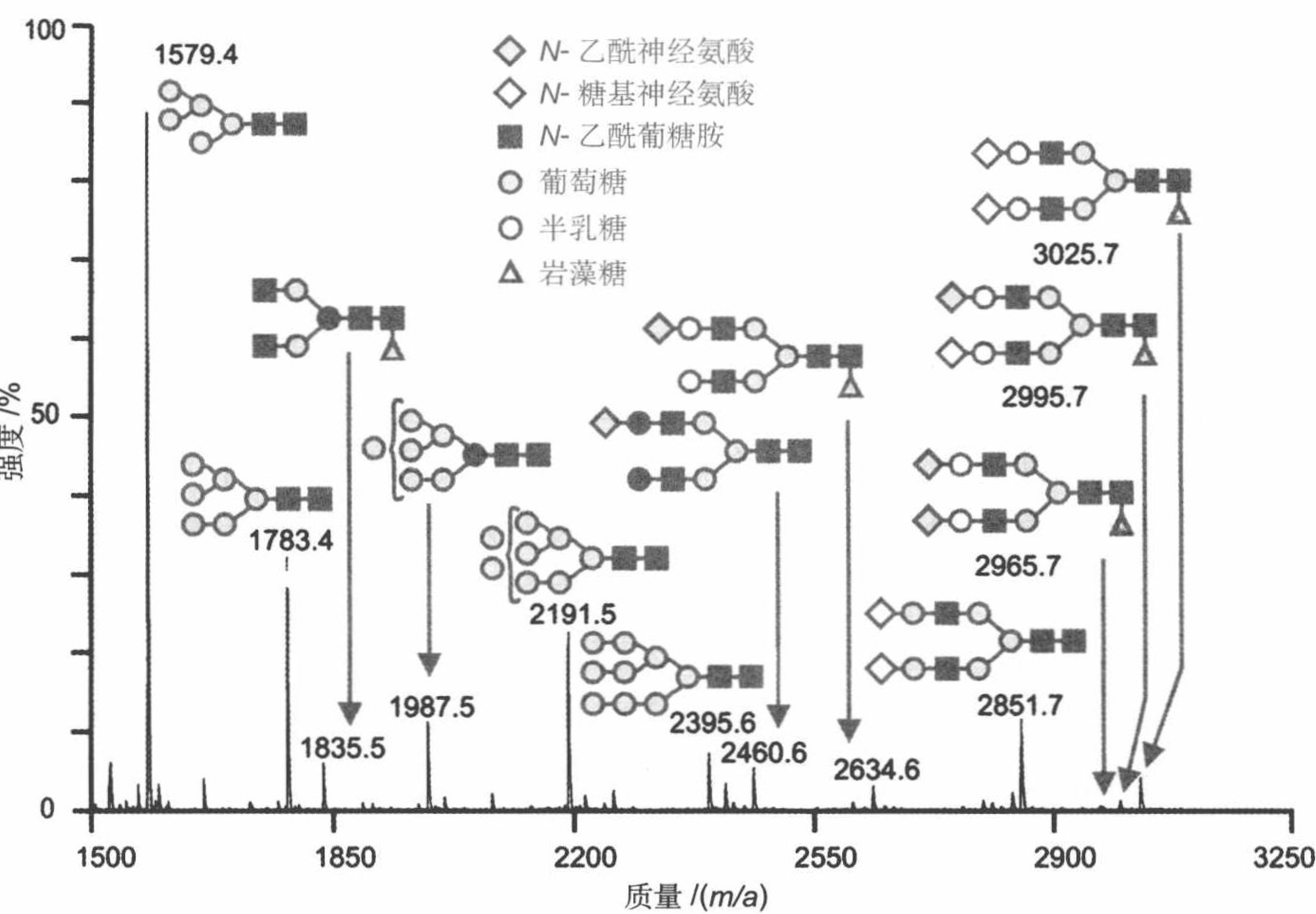


图 6.6 质谱法剖析聚糖。用质谱法分析从小鼠肝脏分离的主要 N- 连接聚糖。给各峰分配的结构都以片段化数据（图 6.4）和与观测质量相符的单糖结构为依据（数据来自伦敦帝国学院 Simon Northt Anne Dell ）

➲有关糖基化工程中序列模体参见 5.1 节和 5.4 节。

6.5 糖组和基因组分析为哺乳动物糖组的整体规模提供了说明

糖基转移酶和聚糖生物合成所需其他酶的序列比较，已界定了若干模体，并用于鉴定糖基因的基因组成员数额。参与聚糖生物合成编码蛋白质的基因总数，估计约为 200 个糖基转移酶基因，30 个核苷酸转运体基因，20 个加工糖苷酶基因和 50 个参与前体生物合成酶基因，再加上像硫酸化修饰类基因，总数超过 300 个基因，约占人类基因组基因总数 1% 稍多些，其生物合成装置的总体复杂性令人注目。

目前，已鉴定的糖基转移酶可以解释多数已知的聚糖结构。但是，预计还有相当数目糖基转移酶的作用有待鉴定。这些酶，可能因为参与生物合成中的结构丰度太低，难以用现有的糖组方法进行检测。N- 连接聚糖的多样性范围可以从结构分析和从我们对其生物合成的知识做出估计。有 500 多个不同的 N- 连接结构已经过详细的化学鉴定，事实表明，可能有多达上千种与哺乳动物糖蛋白中天冬酰胺残基结合的各类聚糖。

6.6 系统糖生物学旨在把糖基因表达与糖基化表型联系起来

基因表达数据和糖组分析之间的相互关系表明，糖基化反应的主要控制点在于相关糖基转移酶的转录。一个长期目标是检测合成聚糖酶的同时，分析细胞和组织中产生的糖组，目的是能从生物合成酶的表达模式预见糖组。达到这样的预见能力仍然存在很大挑战，但是希望能够界定从基因到糖基转移酶和一直到糖组的信息流。虽然缺乏大量糖组数据集和细胞上规范的基因表达数据，现正在研究分析数据的系统生物学（systems biology）方法，虽然已取得了一些成绩，但因为在完好界定的细胞上缺乏大量的糖组学数据集，使制作和检测模型的能力受到了限制。除转录外，以点作为控制的可能性，使这些努力变得更加复杂。

6.7 用聚糖阵列界定聚糖结合蛋白质的靶向配体

由糖组学策略提供的信息，为检测针对聚糖的新型凝集素样识别系统

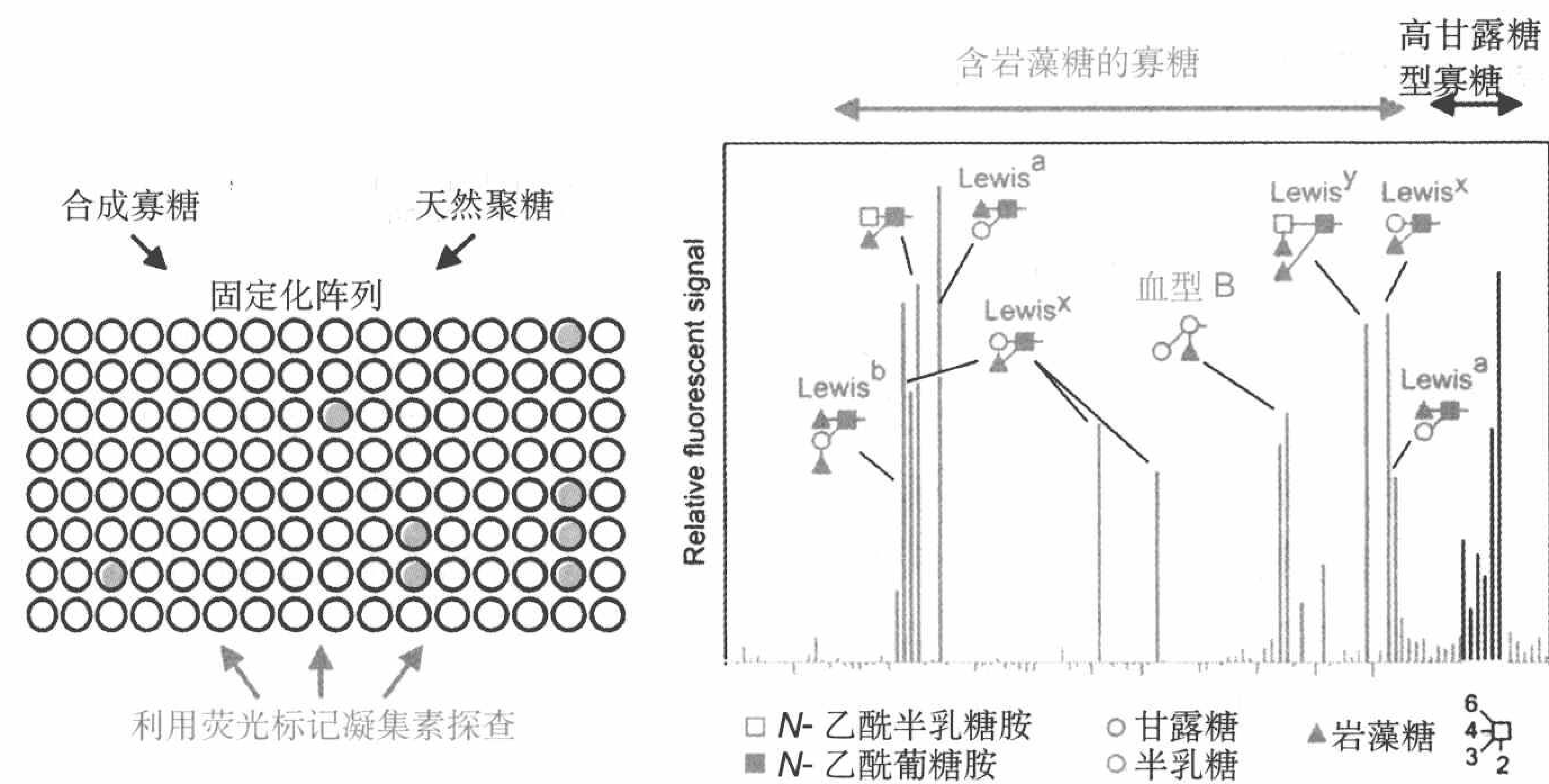


图 6.7 采用聚糖阵列确定聚糖 - 结合受体的选择性。荧光标记的人 DC-SIGN（参见第 9 章）与固定在检测板上个别加样孔中的聚糖结合。明显地与两类聚糖结合：除与高甘露糖寡糖结合外，还与中选结构中末端为岩藻糖和半乳糖或 GalNAc 的聚糖结合 (摘自 Guo,Y., Feinberg,H., Conroy,E., Mitchell,D.A., Alvarez,R., Blixt,O., Tylor,M.E., Weis,W.I., and Drickamer, K.(2004). Structure basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SGN, Nature Structural and Molecular Biology 11,591-598.)

和界定已知聚糖 - 结合受体的靶标奠定了基础。细胞表面潜在的蛋白质和脂质连接的聚糖，以及循环系统糖蛋白共同构成的成员编组知识形成了构建聚糖阵列的基础，这种聚糖阵列（glycan array）由固定在玻片或聚苯乙烯固相载体上的纯化天然聚糖或通过化学和酶促方法合成的聚糖组成。用聚糖 - 结合受体探查聚糖阵列，确定受体的靶标（图 6.7）。在这种阵列上对相关寡糖的受体结合能力进行对比，为我们提供了一种高效方法，用以确定聚糖上哪一部分可以构成受体识别表位。在阵列上筛选结合聚糖的蛋白质，可为蛋白质的结合专一性提供相对完全的画面，还可以与结构信息建立联系，用来更好地了解为什么有些配体能够高亲和性地结合，而有些配体却相互排斥。

有关聚糖合成参见 6.10 节和 6.11 节。

有关 DS-SIGN 参见 9.7 节和 9.8 节。

由于应用聚糖阵列的研究能够更深入地了解聚糖的生物学功能，有时把它称为功能糖组学（functional glycomics）。对受体配体的确定，并与聚糖在何时何处表达的知识联系起来，可以提供有关受体功能的重要信息。用哺乳动物糖蛋白和糖脂制备的阵列，可以用哺乳动物受体探查，研究它们在细胞间相互作用中的功能和糖蛋白的运输，而且这种阵列还可以用细菌和病毒受体进行探测，得知这些病原体如何结合和感染其宿主。反过来，在细菌表面寡糖中出现的一些阵列也可以用哺乳动物固有免疫系统中的糖专一性受体探查，了解它们是如何识别病原体表面的。

有关利用聚糖阵列检测癌症生物标志参见 13.8 节。

6.8 发展中的糖生物学数据库

已有几个关于聚糖信息的在线数据库，尚无某个单独糖库已经达到可媲美于国际化的 DNA 和蛋白质数据库的水平。表 6.1 列出了一组数据库，它们汇集了有关糖组学、合成和降解寡糖的酶，以及聚糖 - 结合蛋白质的信息。多数现有数据库都是回顾性地展示关于糖蛋白上所附着聚糖的分开发表的信息资料，这是一个需要进行极大程度矫治以保证其准确性和完整性的过程。

糖组学的数据、资料在不断的增加，数据库也逐渐在接受有关细胞和组织方面的信息。为保证新数据可以直接存入，数据库目前也正在研发像用于 DNA 序列和蛋白质结构同样的存入机制。数据库针对不同用户，服务的目的也应有不同，服务范围应从已发现的聚糖发展到用于建立结构信息的更为专一的实验结果。与其建立单一集中的数据库，更可设想的是不如去扩充现有的数据库，使其彼此联网，充分利用其各自的优势和它们各不相同的数据处理方式。

除建立聚糖本身的信息系统外，现正在进一步建立有关合成和降解聚糖酶的数据库，在这类数据库中已相对完备地包括了有关人的糖基转移酶，并能确定糖基转移和糖苷酶家族之间的结构和进化演变关系。还有一个重

表 6.1 **糖生物学数据库**

类型	链接
聚糖结构和分析	
CFG: 糖组学数据库	www.functionalglycomics.org >CFG databases > Glycan Structures
SweetDB: 磁共振和质谱数据	www.glycosciences > Databases
聚糖生物合成	
KEGG: 聚糖生物合成途径	www.genome.jp >KEGG PATHWAY > Metabolism [1.7Glycan Biosynthesis and Metabolism]
CAZy: 糖活性酶	www.cazy.org
聚糖结合受体	
动物凝集素资源	www.imperial.ac.uk/research/animallectins/
CFG: 糖结合蛋白质数据库	www.functionalglycomics.org/CFGparadigms

注：链接 2010 年 9 月开通。

要目的是建立这些酶的性质与聚糖结构相关性数据库。例如，希望最终能利用这些数据库可以预见在人类糖组中合成任何聚糖时所需要的酶。

6.9 利用凝集素分析细胞和组织中糖缀合物

专一性结合寡糖的植物或动物凝集素，可以用来鉴定特定糖的结构。在这方面，植物凝集素特别有用，因为植物凝集素常与聚糖中特定寡糖序列高选择性地结合。例如，糖蛋白或糖脂血型 A 三糖与植物凝集素的结合，可以作为糖缀合物聚糖部分中存在血型序列的证明。凝集素能够检测糖缀合物中完整的特异聚糖结构，可以广泛地用于染色从聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的糖蛋白混合物，或从薄层层析分离的混合物。另外，凝集素通过与探针，如与荧光标签（可用显微镜观测）缀合，可用于特异聚糖的定位（图 6.8）。与特异聚糖序列结合的抗体也可以按同样分式使用。按此方式，凝

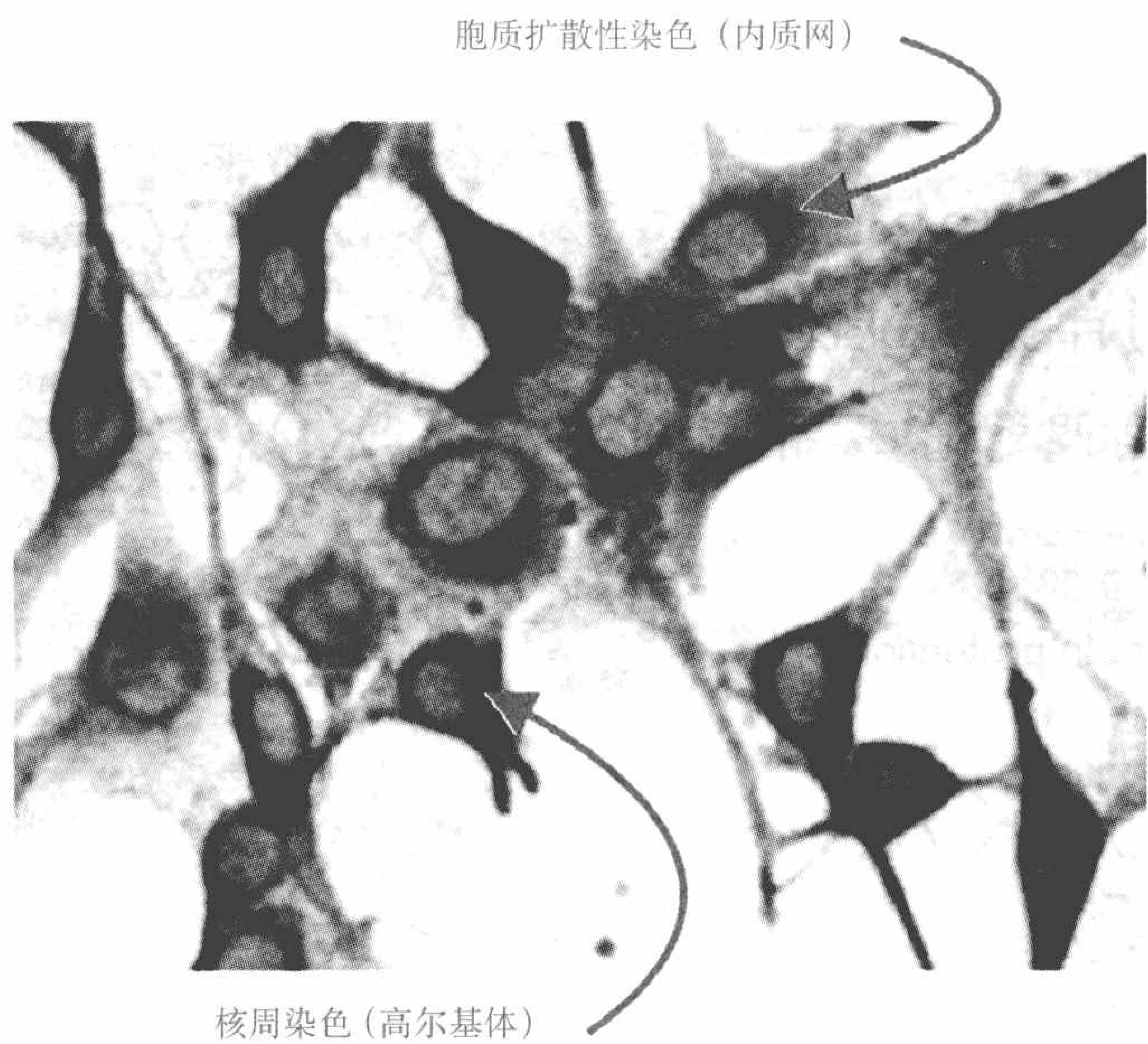


图 6.8　用伴刀豆球蛋白 A 凝集素染色成纤维细胞。这种凝集素可检测出现在内质网和高尔基体区室糖蛋白上的 N- 连接聚糖（经许可修改自 Tian, E, TenHagen, K.G., Shum, L., Hang, H.C., Imbert, Y., Young, W.W., Jr., Bertozzi, C.R., and Tabak, L.A.（2004）An inhibifor of O-glycosylation induces apoptosis in NH13T3 cells and developing mouse embryonic mandibular tissues, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50382-50390)

集素与抗糖抗体，还可以在聚糖结构化学分析和聚糖生物学功能研究之间架起一座座重要桥梁。

6.10 化学法合成小分子寡糖

➲有关寡糖作为癌症疫苗的信息参见 **13.8** 节。

可得到的天然资源生物大分子的数量有限，往往不能满足研究这些大分子构象和功能的需要。化学法合成寡糖可以满足研究均一性聚糖所需的数量。

合成寡糖还有两方面的困难，一方面，在合成过程中的偶联阶段，必须制成含有单一异头物的寡糖。在无法用化学法获得完全的异头物特异性的情况下，产生的 α 异头物和 β 异头物混合物必须经过分离和纯化，此项操作既费时又费力，收率也要降低。这一合成过程还要求不能采用固相载体。遇到的另一困难是用于合成线形肽和核酸所研发的化学稳定性分级系统必须重新调整以便适用于分支寡糖的合成（图 6.9）。为建构不同的分

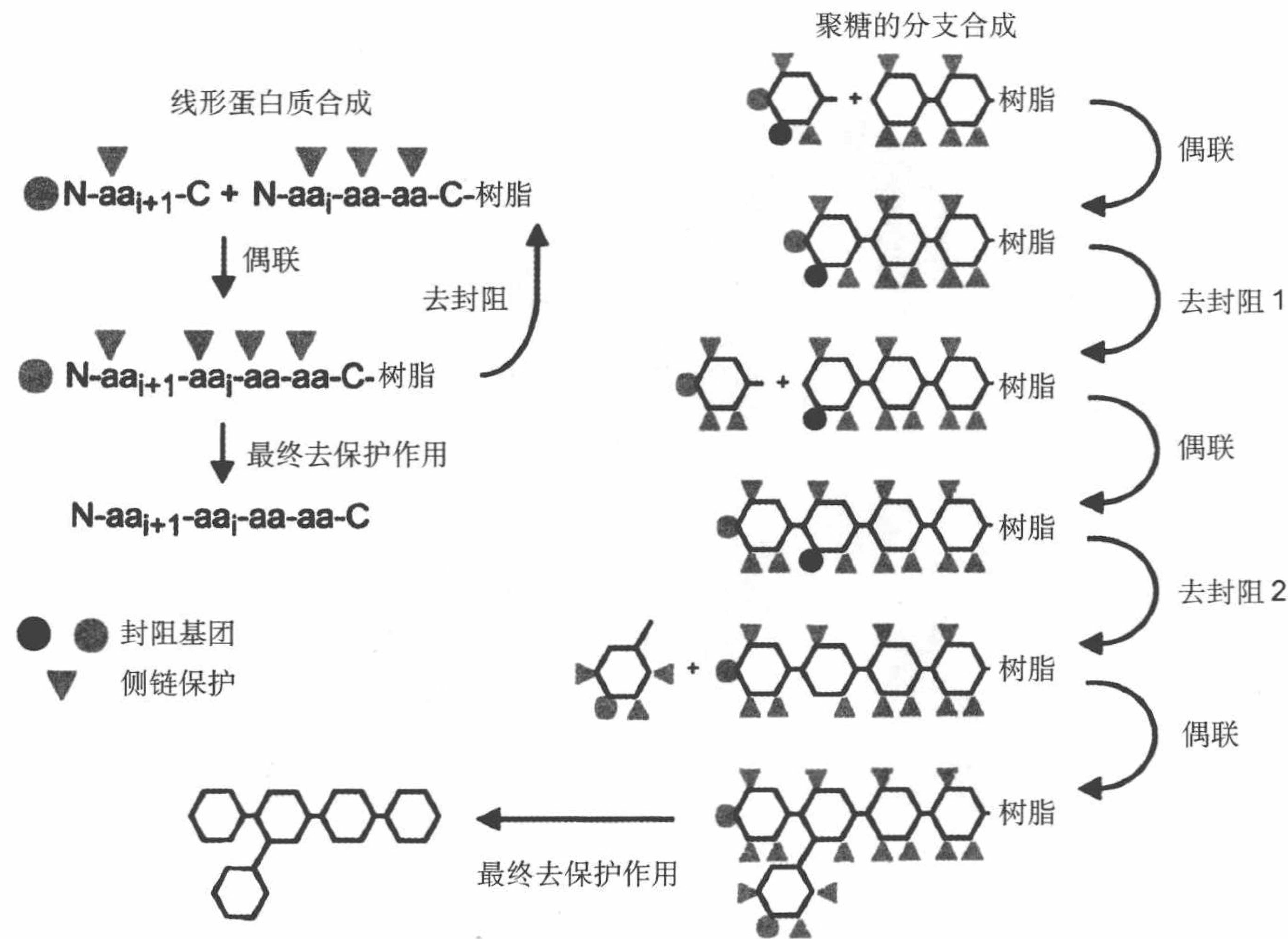


图 6.9 肽和寡糖化学合成策略的比较。肽合成中 C- 端氨基酸的羧基通过稳固的连键与树脂缀合，洗除反应步骤之间的试剂。整个合成过程中支链保护基团始终保持稳定，而且每一相继到来的氨基酸的氨基都载有易分解清除的封阻基团，以便偶联下一个残基。由于多数聚糖都有分支结构，必须具有两层以上封阻基团的稳定性，才能使羟基自由反应，建构一个分支，而后释放第二个羟基并与之反应，形成第二个分支

支结构，需要在各羟基上设计制备定制的具有封阴和保护作用基团的前体。尽管存在这些挑战，已经建立起生物学上具有重要作用的、相对较小寡糖的合成流程。

6.11 酶法是寡糖的另一合成方法

酶法是化学方法之外另一寡糖合成方法。可以表达专一性已知的克隆糖基转移酶，并且常用以建构适宜的连键。这一方法的不足之处是在合成各阶段须用核苷酸糖作为供体。但是在合成流程中可以采用其他一些相对价廉的原料回收利用核苷酸糖（图 6.10）。已在合成各种寡糖所需核苷酸糖供体中建立了酶的循环利用系统。随有效性克隆糖基转移酶不断的增加，未来将有更多的在生物学上具有重要意义的糖供体出现。

➲有关生物技术中糖基转移酶的利用参见 13.5 节。

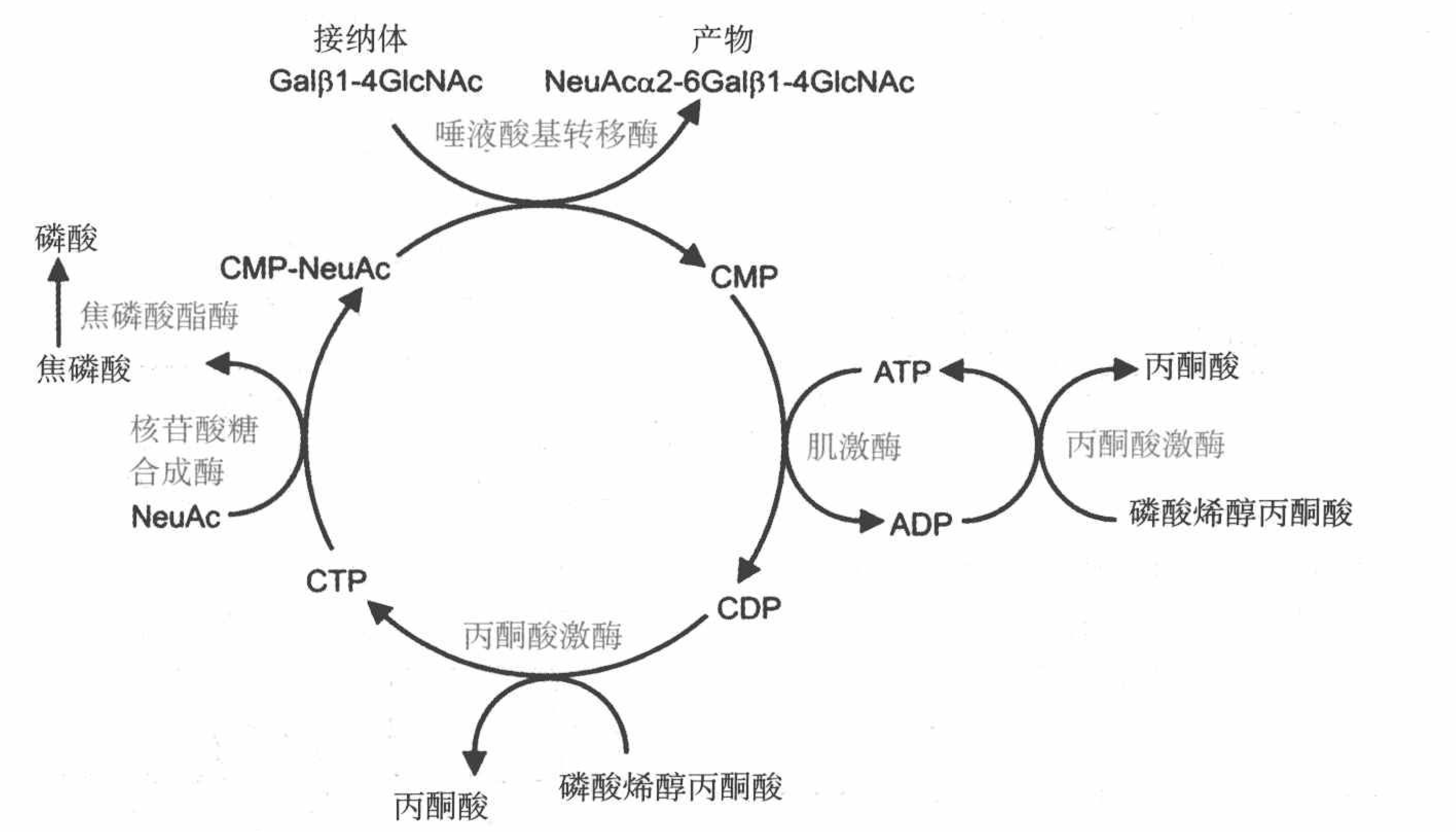
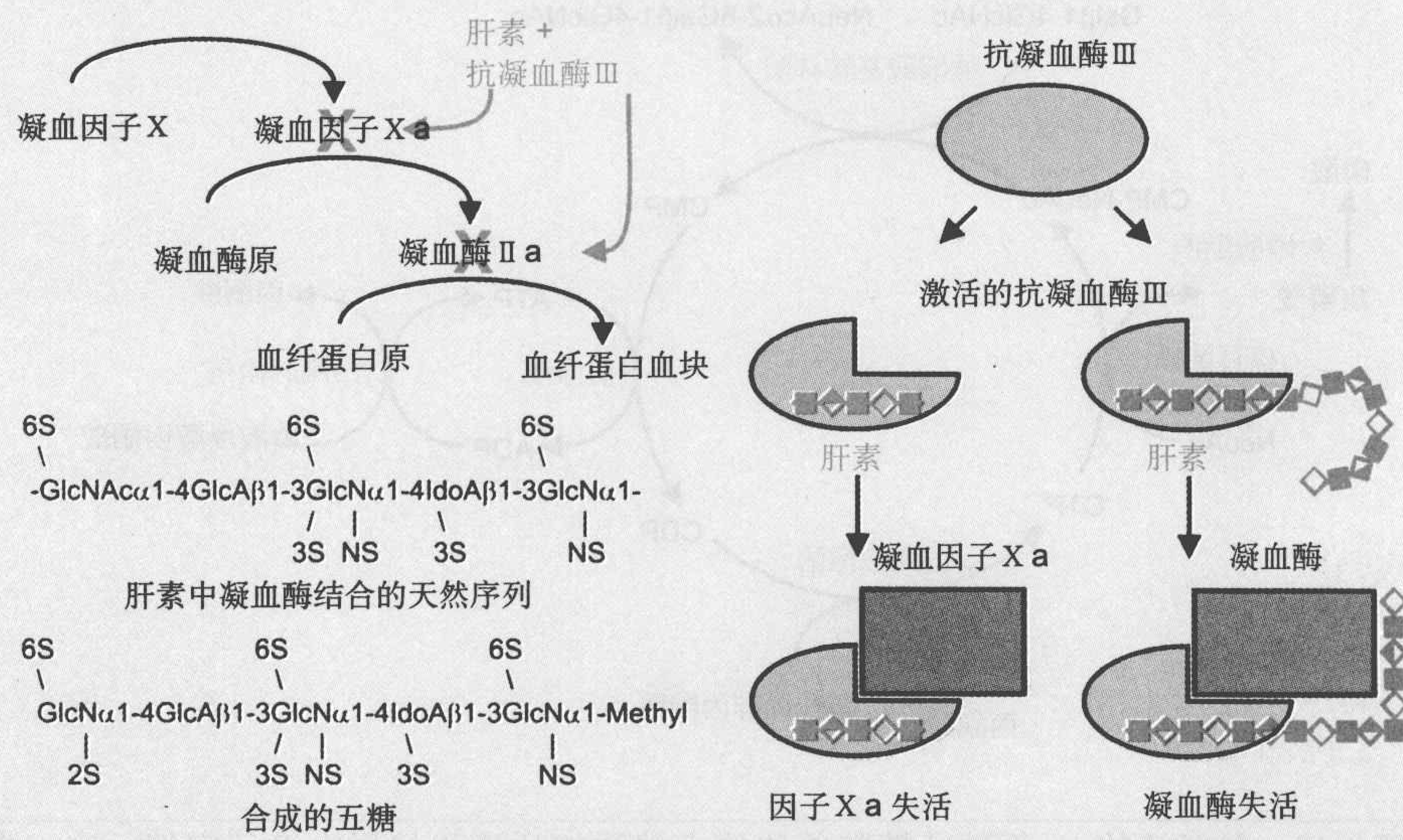


图 6.10 在聚糖的 *N*- 乙酰乳糖胺单位的末端添加唾液酸的再生循环实例。这一类型的唾液酸化结构常在复合 N- 连接寡糖中出现。同样的再生循环也可以应用于聚糖合成的其他步骤。某些情况下，这一策略同样也可以用于掺入非天然糖类似物。ADP. 腺苷二磷酸；ATP. 腺苷三磷酸；CDP. 胞苷二磷酸；CMP. 胞苷一磷酸（cytidine diphosphate）；CTP. 胞苷三磷酸（摘自 :Sears,P., 和 Wong,C.H. (1996) Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A .**93**,12086—12093）

已采用合成肽和寡核苷酸的方法创建与天然分子仅有微小差别的类似物，如单一氨基酸残基或个别碱基被取代者。能够在聚糖中创造类似变化的技术也将非常有用。化学合成法似乎更适合于创建非天然寡糖，但有些糖基转移酶还可以用于添加新糖（正确的供体糖）。创建新连键的能力，可能需要修饰转移酶，这在我们对其结构有了更广泛认识后，将成为可行技术。

框6.1 糖疗法　*合成肝素寡糖用于控制血块的形成*

蛋白酶激活级联反应中意外的激活或延长激活，导致血液凝固，可能形成不当的血块。释放到血液中的血块可能埋入腿部或肺部血管，形成深度静脉血栓或肺栓塞。抗凝血酶Ⅲ是产生血块血纤蛋白途径中最后步骤的关键性调节物，可以抑制激活形式的凝血酶（凝血因子Ⅱa）和激活凝血酶的蛋白酶（凝血因子Ⅹa）。在血管内皮细胞表面结合蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素（第3章）能促进抗凝血酶Ⅲ与凝血酶和凝血因子Ⅹa间的相互作用，防止循环系统中未受干扰部分形成血块。肝素，这种从猪肠黏液分泌细胞中分离的高度硫酸化形式的乙酰肝素早就用于防治血块的形成。在接受髋关节和膝关节置换手术患者中用肝素防治形成血栓，非常有效。



在整体组成上，肝素与细胞表面蛋白聚糖结合的硫酸乙酰肝素相类似，但肝素作为抗凝血酶Ⅲ激活剂的效果特别好。肝素断裂为寡糖，然后分离出可以激活抗凝血酶Ⅲ的片段，用于鉴定肝素中结合抗凝血酶Ⅲ的特异性五糖序列。这种结合造成抗凝血酶Ⅲ的构象变化，导致精氨酸残基暴露，暴露的精氨酸与凝血因子Xa即凝血酶蛋白酶的活性中心结合。通过制备含天然结构和不同修饰形式的合成寡糖，证实了五糖内部个别硫酸乙酰肝素主链修饰作用具有主要意义。虽然五糖可以充分促进抗凝血酶Ⅲ与凝血因子Xa相互作用，但抑制凝血酶还需要较长的肝素寡糖。五

糖除结合抗凝血酶Ⅲ外，这些寡糖还含有以相对非特异方式与凝血酶表面正电荷斑片相互作用的负电荷序列，因此，可以稳定凝血酶 - 抗凝血酶Ⅲ复合体。

从天然资源制备肝素，因为每批原料来源不同，而且可能受到传染性媒介的污染，因此采用化学法研发合成抗凝血酶Ⅲ结合五糖作为替代治疗药物就应运而生。目前临床上许可采用的合成原料几乎与天然五糖没有区别。这种药缺乏结合凝血酶的另一段序列，因此只能激活抗凝血酶Ⅲ与凝血因子 Xa 的结合，但实际上，抑制 Xa，也就是减少了凝血酶的激活。

从富产原料，如从葡萄糖、葡糖胺和硫酸等合成这一化合物，需要经过流程中 50 多个步骤，因此，目前正在研发结构相似，合成方法简单易行，而且具有可以激活抗凝血酶Ⅲ的化合物为可替代的第二代药物。另外，也在探索开发具有第二个凝血酶二次结合位点的更复杂的化合物，可以作为抗凝血酶Ⅲ抑制凝血酶的激活剂。这种化合物在临床上可能有更广泛的药用潜力，如在需要抑制凝血酶和凝血固子 Xa 的场合。不过，在制备这种大分子抑制剂时，可能还需要采用化学 - 酶促联合合成方法。

论述题

- 描述用于界定抗凝血酶Ⅲ结合肝素五糖片段的分析和合成方法。
- 讨论如何证实肝素在抗凝血酶Ⅲ激活反应和桥连凝血酶中的双重作用，并讨论在开发新药阶段如何发挥这些作用。

主要文献

- Bauer, K.A. (2003). New pentasaccharides for prophylaxis of deep vein thrombosis, *Chest* **124**, 364S-370S.
- Johnson, D.J.D., Langdown, J., and Huntington, J.A. (2010). Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-Å structure of the ternary complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **107**, 645-650.
- Laremore, T.N., Zhang. F., Dordick, J.S., Liu, J., and Linhardt, R.J. (2009). Recent progress and applications in glycosaminoglycan and heparin research, *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 633-640.
- Petitou, M. and van Boeckel, C.A.A. (2004). A synthetic antithrombin binding pentasaccharide is now a drug: what comes next?, *Angewandte Chemie, International Edition* **43**, 3118-3133.

6.12 化学法连接糖和蛋白质或脂质创建新型糖缀合物

聚糖的许多生物功效只在与蛋白质连接的背景下，才能得到证实。出于这些原因，如能以位点专一性的方式将修饰后的聚糖与蛋白质缀合，创

建准确界定结构的糖蛋白，将非常有用。已经开发出创建合成这种新型糖蛋白（neoglycoprotein）的化学方法。例如，单纯的单糖和寡糖可以与非糖基化的载体蛋白质，例如血清白蛋白结合。以这种方式创建的新型糖蛋白已经很好地用于验证和鉴定凝集素。这一方法的一个特殊优点是能够控制糖配体的密度。

化学法合成新型糖蛋白中的聚糖与蛋白质的连键通常是由赖氨酸或半胱氨酸的侧链连接。还没有发现以现有化学法能够按天然糖蛋白方式由聚糖与天冬酰胺残基结合。因此，具有特定 N- 连接聚糖的糖蛋白的合成必须采用生物合成途径。添加糖基化途径中特定步骤的抑制剂，可被用于生成独特的聚糖结构。在缺少专一性糖基转移酶的突变细胞系中产生蛋白质可以取到同样效果。也可以在体外修饰现有结构，如利用糖苷酶清除甘露糖和利用糖基转移酶重新构建新结构的聚糖。

有关突变细胞系参见 5.7 节。

有关制备其他聚糖用酶参见 13.5 节。

小　结

多数糖蛋白结合的聚糖都是常见的一些聚糖，常用常规的分析方法鉴定出现的这些结构，但确定某些特殊结构则采用酶消化和质谱碎裂方法。凝集素和抗体也可以用于检测专一性糖结构，而且可以专门用于聚糖在细胞和组织中的定位。聚糖剖析方面最近的进展，对细胞和组织的糖组提供了更深入的见解。现正在研发将合成聚糖的酶和识别聚糖的聚糖结合受体的信息和知识联系起来的实验和信息学方法，虽然，这些仍处于发展阶段，但在分析聚糖构象和功能方面会越来越显示出其主要意义。

主要参考文献

Bartolozzi, A. and Seeberger,P.H. (2001). New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccha rides, *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 587-592. 这篇为寡糖化学合成进展的评论文章和由 Wong(2005)(见下) 发表的化学合成寡糖的文章。

Dell, A. and Morris, H. R. (2001). Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science* **291**, 2351-2356. 本文为测定结构的质谱法并说明在糖生物学中的应用。

Drickamer, K. and Taylor, M. E. (2002). Glycan arrays for functional genomics, *Genome Biology* **3**, 1034. 1-1034. 4. 这是一篇关于聚糖阵列发展战略的述评文章。

Duus, J. Ø., Gotfredsen, C. H. , and Book, K. (2000). Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations, *Chemicaf Reviews* **100**, 4589-4614. 本篇述评是传统的用核磁共振分析聚糖结构的方法，随后再选择最近发展起来的方法。

Dwek, R. A., Edge, C.J., Harvey, D.J., Wormald, M. R., and Parehk, R. B. (1993). Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides, *Annual Review of Biochemistry* **62**, 65-100. 这篇论文和 Fukuta 和 Kobata (1993)(见下) 的论文为聚糖结构分析提供了详细的基本方法。

Feizi, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycotipids are oncodevelopmental antigens, *Nature* **314**, 53-57. 一篇经典的总结性的利用抗体探测糖缀合物的方法的文章。

Fukuda, M. and Kobata, A. (1993). Glycobiology: *A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. 见上 Dwek 等 (1993) 的文章。

Nairn, A. V., York, W. S., Harris, K., Hall, E. M., Price, J. M., and Moremen, K. W.(2008). Regulation of glycan structures in animal tissues: transcription profiling of glycan-related genes, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 17298-17313. 现正在采用的糖基因表达实例的简介。

Rudd, P.M. and Dwek, R. A. (1997). Rapid, sensitive sequencing of oligosaccha rides from glycoproteins, *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 488-497. 聚糖释放、标记和测序方法的述评。

Taylor, M. E. and Drickamer, K. (2009). Structural insights into what glycan arrays tell us about how glycan-binding proteins interact with their ligands, *Glycobiology* **19**, 1155-1162. 如何利用聚糖阵列筛选用于与聚糖结合受体结构信息相互关联的论述。

Wong, S. Y. C. (1995). Neogtycoconjugates and their applications in glycobiology, *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 599-604. 制造糖缀合物方法的论述性文章及其在实验上的用途。

Wong, C. H. (2005). Protein glycosylation: new challenges and opportunities, *Journal of Organic Chemistry* **70**, 4219-4225. 见上 Bartolozzi 和 Seeberger(2001) 的文章。

习　题

6.1 通过酶顺序降解和色谱法分析唾液酸化三天线复合寡糖结构需要哪些酶?

6.2 当用质谱分析法排布寡糖的结构时，说明为什么有关 N- 连接和 O- 连接聚糖生物合成途径的知识是必备的。

6.3 你在研究具有 3 个可能的 N- 基化位点，并在其胞外区有一含数个苏氨酸残基的富含脯氨酸序列的细胞表面受体。你在中华仓鼠卵巢细胞中以可溶形式

表达受体，并从介质中能纯化得到 1mg 受体。问题是：你用什么方法鉴定受体表达形式的糖基化？

6.4 进 入 **http:/www.functionalglycomics.org/glycomics/common/jsp/firstpage.jsp** 网站 Consortium for Functional Glycomics 网页，打开数据库，分次进行搜索。第一次搜索聚糖相对分子质量 1680~1720（键入 1700±20），查看结构。然后重启搜索找到哪些聚糖具有这一范围的分子质量，（a）N- 连接聚糖；（b）O- 连接聚糖；（c）N- 连接复合体；（d）人 N- 连接复合体（键入 homo for species）。在这一分子质量大小的聚糖中为什么 N- 连接聚糖多于 O- 连接聚糖？

6.5 描述以往分析 P- 选凝素糖蛋白配体 -1 上 O- 连接聚糖结构所用的方法。

参考文献：Wilkins, P.P., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1996). Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18732-18742.

6.6 讨论如何应用聚糖阵列与其他技术联合确定糖结合蛋白的特定寡糖配体，并能深入理解蛋白质的生物功能。

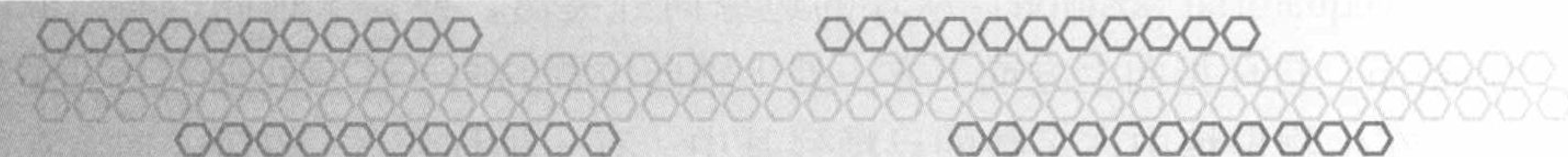
参考文献 Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M.E., Alvarez, R., Bryan, M. C., Fazio, F., Calarese, D., Stevens, J., Razi, N., Stevens, D.J., Skehel, J.J., van Die, I., Burton, D.R., Wilson, I.A., Cummings, R., Bovin, N., Wong, C.H., and Paulson, J.C. (2004). Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **101**, 17033-17038.

Bochner, B.S., Alvarez, R.A., Mehta, P., Bovin, N.V., Blixt, O., White, J.R., and Schnaar, R.L. (2005). Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 4307-4312.

Coombs, P.J., Graham, S.A., Drickamer, K., and Taylor, M.E. (2005). Selective binding of the scavenger receptor C-type lectin to Lewis^x trisaccharide and related glycan ligands, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 22993-22999.

寡糖构象

7



学习目的

学习本章后应知内容：

1. 用于描述聚糖构象扭转角的定义
2. 确定聚糖构象相互作用的特性
3. 分析聚糖构象的实验方法
4. 多糖连键如何赋予多糖有用的大型构象

糖生物学的重要内容之一是研究聚糖结构与其功能之间的关系。具有不同共价结构的聚糖形成不同的构象，这与不同序列蛋白质具有不同的三级结构或折叠模式的方式相同。蛋白质的序列决定蛋白质的三维结构，而三维结构又决定蛋白质的功能。类似的规则很可能同样也适用于寡糖。不过确认聚糖结构－功能关系的原理并非易事，部分原因是因为我们对聚糖构象的了解还很有限。本章扼要介绍已知的 N- 连接寡糖的三维结构。

7.1 寡糖的三维结构被称为构象

由于寡糖可有分支，常不适合用序列（sequence）这一术语来指称己糖和己糖胺结构单元之间的连接方式。为此，通常用结构（structure）这一术语来表示聚糖的共价结构。因而就不能像在 DNA 和蛋白质中那样用解构一词作为三维结构的简称。为避免混淆，更常用构象（conformation）这一术语来指称寡糖在三维空间的排列方式。

7.2 单糖的构象数目有限

比较而言，聚糖中的己糖和己糖胺残基是刚性的，理论上它们可有几

种不同的构象（图 7.1）。一般情况下，其椅式构象（chair conformation）优于船式构象，因为船式构象（boat conformation）会使吡喃糖环内的原子发生拥挤。在不同的椅式构象中，连接在吡喃糖环上的各基团或处于平伏位置（equatorial position）从环的边缘向外突出，或处于轴向位置（axial position）自环指向上方或下方。处于轴向位置的原子在空间很容易发生碰撞。在生物聚糖中占多数的己糖残基中，有一种称作 $^4C_1$ 的椅式构象在能

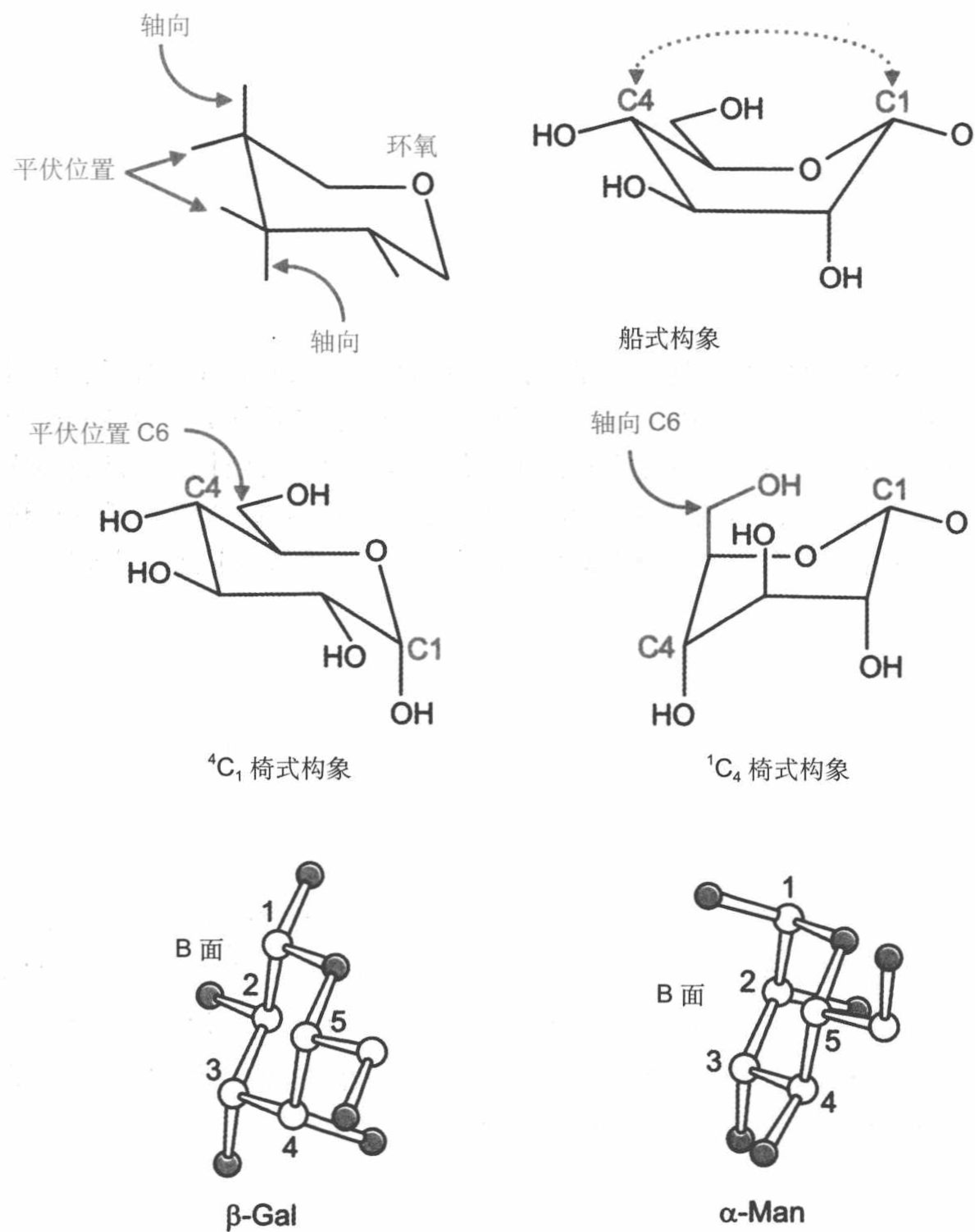


图 7.1 单糖构象。C1 和 C4 上氢原子间的拥挤现象会使船式构象的稳定性不如椅式构象。$^4C_1$ 椅式构象的拥挤程度最低，因为环外的 C6 和 2 位、3 位、4 位的羟基都处于平伏位置，而 $^1C_4$ 椅式构象中的这些羟基则处于轴向位置。按逆时针顺序排列编号的碳原子所在的面，被定义为非极性 B 面

力学上较为有利，因为这种排列方式把庞大的 C6-O6 基团和多数羟基置于平伏位置。在此构象中，吡喃糖环的一个表面相对而言是非极化的，这就是已糖中经常出现的 B 面。

●有关非极性 B 面的重要性参见 10.7 节。

以吡喃糖环作为固定单位，就大大简化了聚糖构象的描述。蛋白质结构的特征是取代基比较少，因此也很少侧链构象变化。不过，也会发生绕 C5-C6 键的转动（图 7.2）。就任何单键而言，交错构象（staggered conformation）更为可取，因为这类构象可使连接在转动键两端原子上的原子间距离最大化。可用扭角 ω（torsion angle ω）来描述这种转动。氨基醇中也有绕 C2-N2 键的旋转柔性。

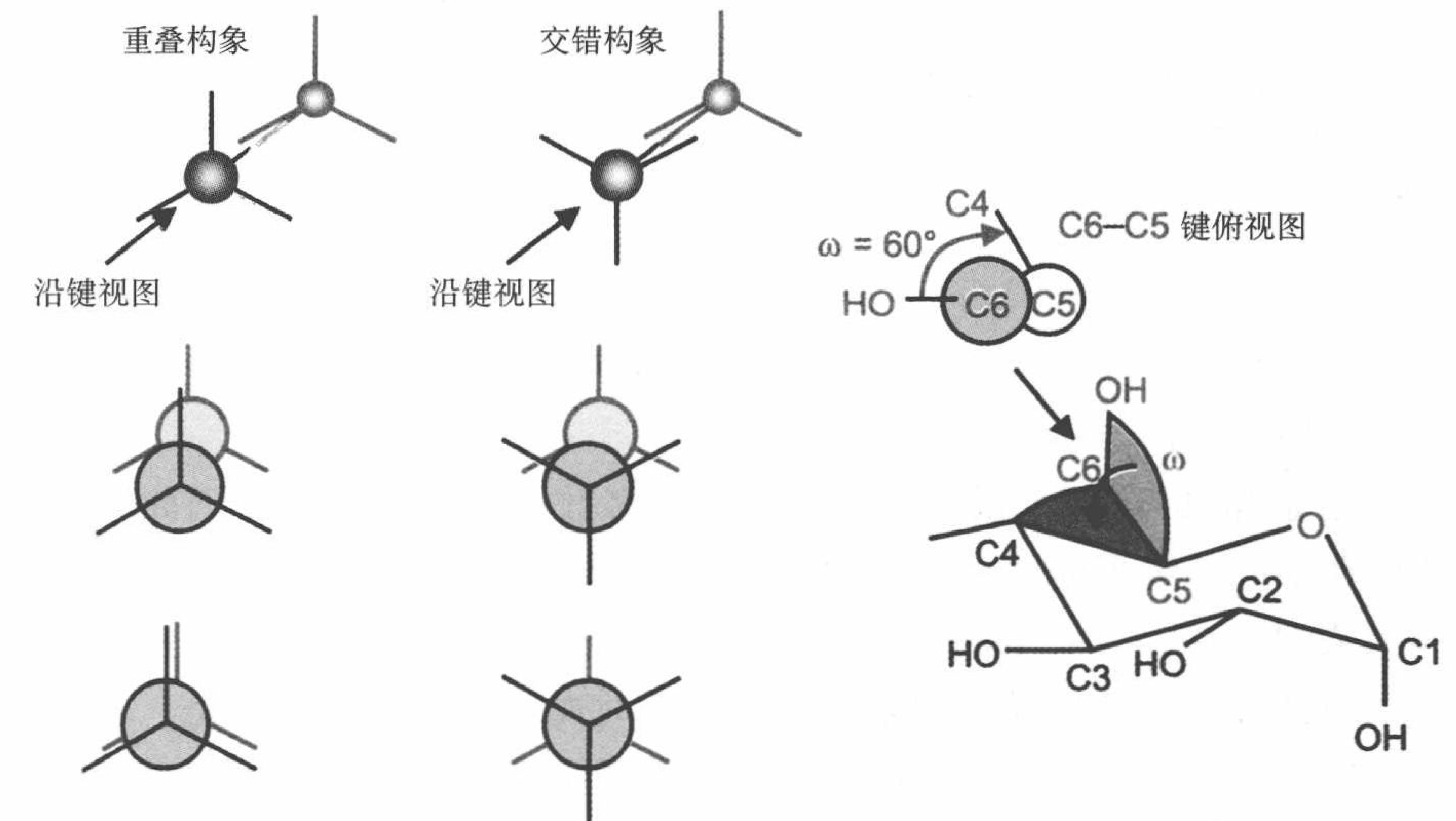


图 7.2 绕单键转动可能产生的代表性构象。交错构象有利于使原子间距离最大化。转动 120° 可以形成三种可能的交错构象。纽曼投影（Newman projection）提供了一种表示构象的简略方法。C5-C6 键的旋转柔性用 ω 角表述，用以度量 O6-C6-C5(蓝色)和 C6-C5-C4（灰色）所在平面之间的夹角，也可以把这个角表述为 O6-C6-C5-C4 扭角

7.3 用于描述聚糖构象的扭角

单个糖残基的构象大都已经熟悉，故描述寡糖的构象，主要是描述残基间糖苷键的连接问题。用以描述此类糖苷键构象的扭角类似于描述多肽主链构象的扭角(图7.3)。糖苷键中有两个单键，因此需用两个扭角 φ(torsion

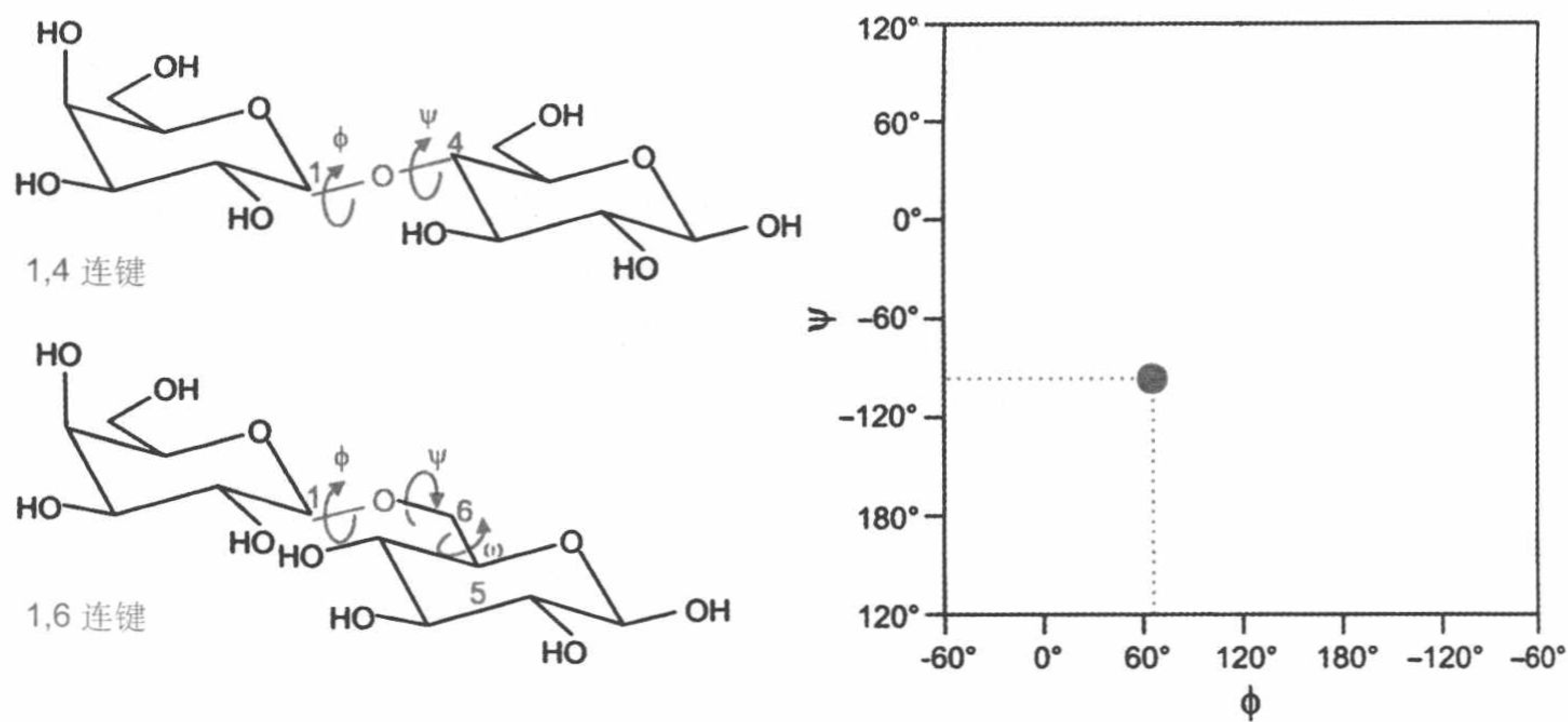


图 7.3 糖苷键中的扭角与标绘图。界定多数糖苷键构象的界定需用两个扭角 φ 和 ψ，而描述 1,6 连键还需要另一个 ω 角。这样，可在 ψ-φ 二维平面图上描述多数糖苷键的构象

angle φ）和 ψ 一起来描述连键的构象。对连接于 O6 的糖苷键的情况下，其总体构象还将受 ω 角度值的影响。

用 φ 和 ψ 这两个扭角，足以描述大多数糖苷键的构象，因此可以方便地在 φ-ω 二维平面图上表示糖苷键的可能构象，这种图与描述蛋白质主链构象的拉氏图（Ramachandran plot）相类似。这种平面图便于用来比较不同的糖苷键构象。描述构象的能量约束时尤为有用。遗憾的是，在如何定义扭角的约定方面尚未达成完全一致的意见，因此在比较不同来源的扭角图时，必须小心谨慎。本书采用的是晶体学中所用的约定。

7.4 糖苷键的可能构象受制于局域位阻和电子相互作用

决定聚糖构象的首要约束条件是，某一扭角组合是否会导致所连接的两个己糖或己糖胺残基之间产生难以接受的空间碰撞。对肽键而言，约有四分之三的可能构象是不可及的，因为许多扭角的组合会使肽键两侧的原子过于密集。把原子视为由范德瓦尔斯半径界定的硬球，注意扭角改变时所呈现的构象，可查出被排除的构象。仅考虑这些糖苷键的位阻效应，并

不能排除如此高份额的扭角组合。不过，综合考虑局域位阻效应和糖苷键电子性质的联合作用，可以确定扭角的优先值。

从 ϕ 角出发有助于说明不同局域相互作用的影响（图 7.4）。基于位阻效应的考虑，可以预计对应于糖苷键两端原子上取代基相互错开的位置，扭角有三个可能的优先值，对于 ϕ 角，这些对应的角度值分别为 −60°、+60° 和 +180°。在这些可能的角度值中选择最稳定的值，将部分地取决于取代基的大小。对优先扭角的电子效应是由于吡喃糖形式的己糖和己糖胺 C1 的两侧有两个氧原子，每个氧原子又各有两条含未共享电子对的 sp^3- 杂化轨道（图 7.5）。环氧的两条轨道的取向由环的几何形状固定，而糖苷氧的轨道取向由 ϕ 角描述。ϕ 角的优先值是使未共享电子对之间的距离最大化的角度值，对 *D*- 己糖中 α 连键为 +60° 和 *D*- 己糖中 β 连键为 −60°。被称为外 - 顶端基异构效应（exo-anomeric effect）的这一现象可以使这些角度值在能力学上比其他角度值更为有利，实际上这些值显然也是最常观察到的。外 - 顶端基异构效应虽是已经实验证实的事实，但其真正的电子基础仍比这里所讨论的轨道排斥说要复杂得多。由于电子相互作用参与了双键的形成，因此外 - 顶端基异构效应对 ϕ 角的限制与多肽中肽键必须在同一平面的限制非常相似。

对 ψ 角虽无外 - 顶端基异构效应，对某一特定的连键而言，位阻效

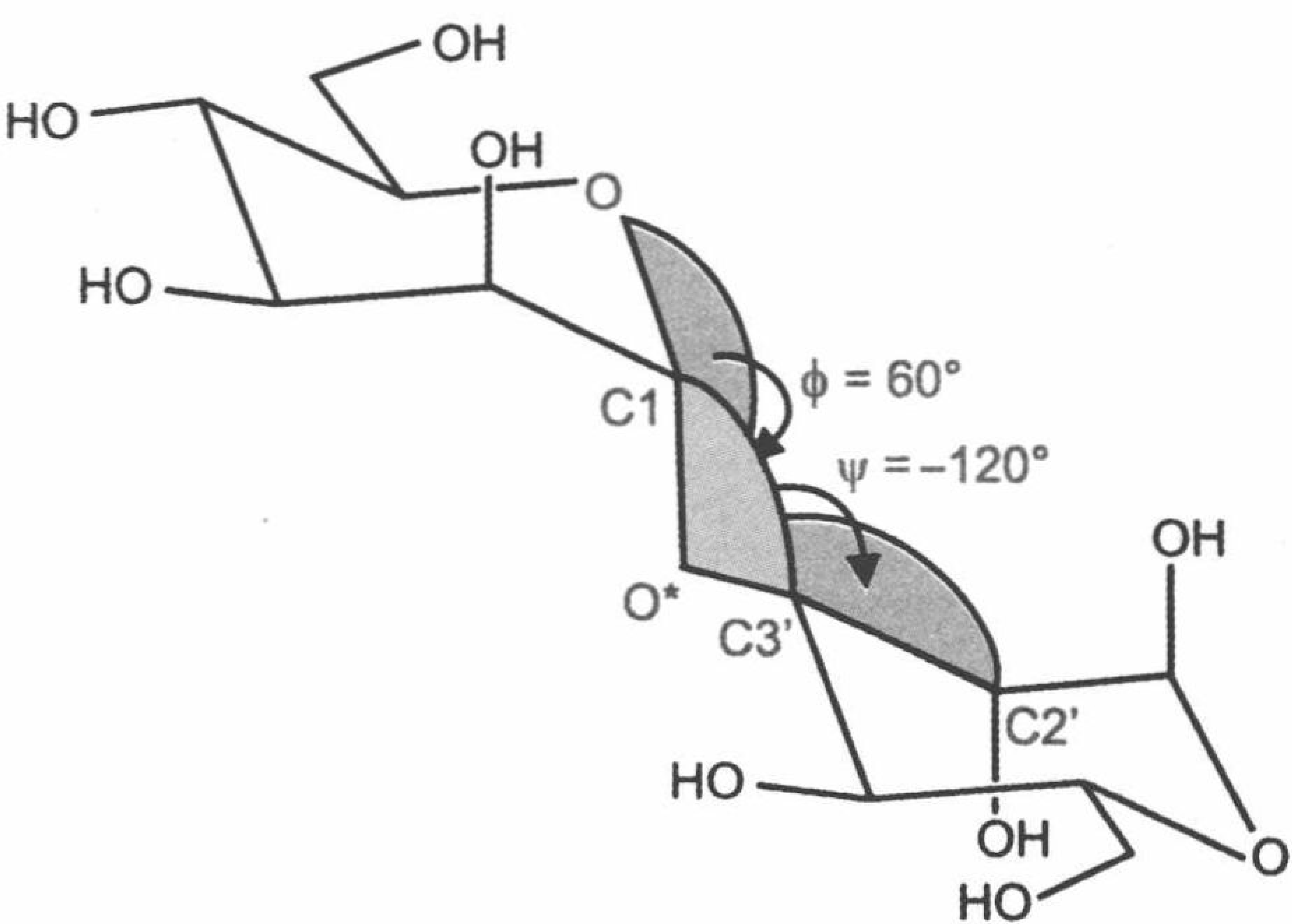


图 7.4 扭角的定义 形成糖苷键的氧原子标记为 O*。ϕ 角是在 O—C1—O* 平面（蓝色）和 C1—O*—C4′平面（灰色）之间度量的夹角，此角亦称作 O—C1—O*—C4′扭角。ψ 角为 C1—O*—C4′平面（灰色）和 O*—C4′—C3′平面（蓝色）间量度的夹角，因此亦可称为 C1—O*—C4′—C3′扭角

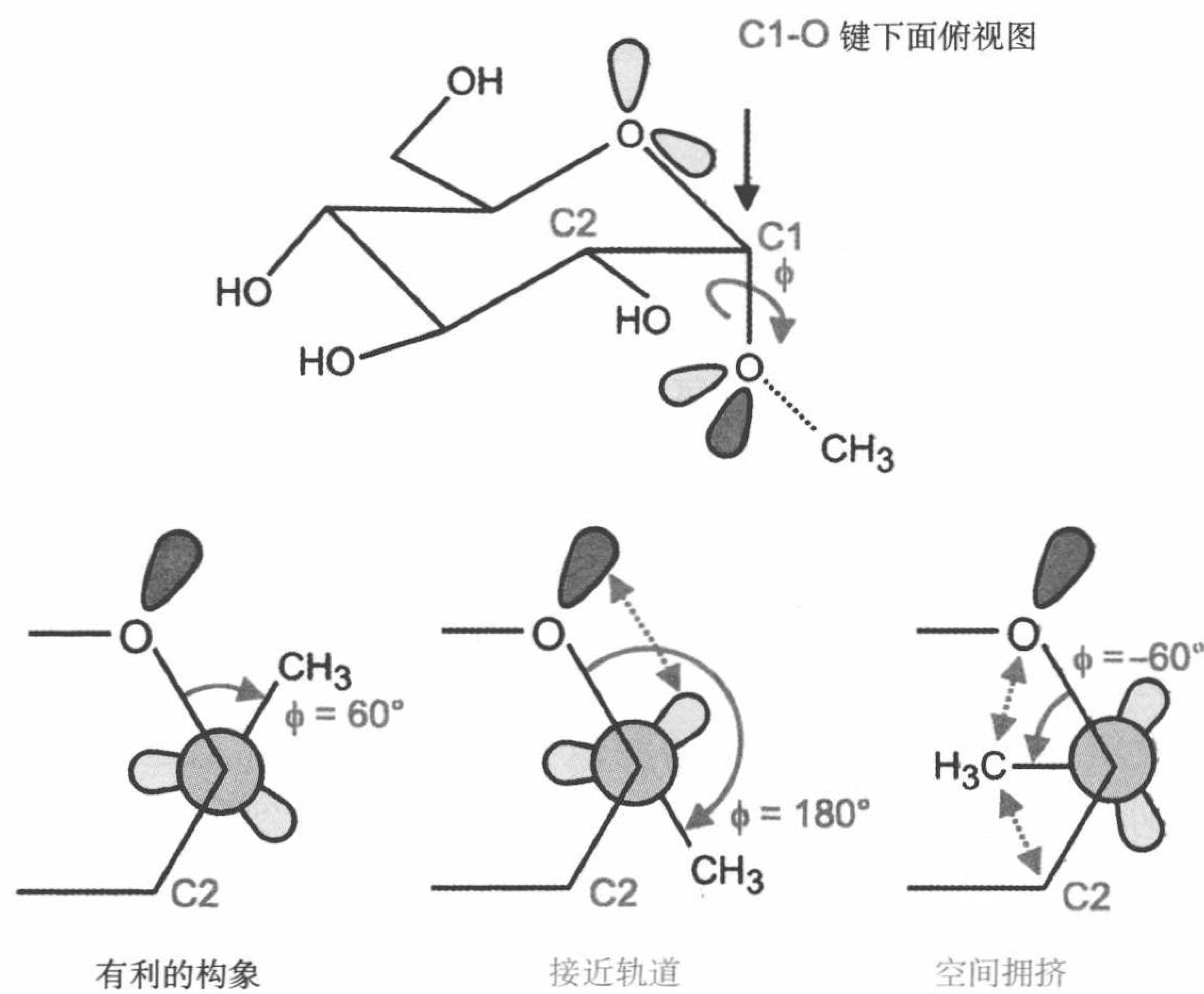


图 7.5 α- 连键的外端基异构效应。当 ϕ 角为 –60° 时，会使空间拥挤和绕氧（环氧和形成糖苷键的氧）原子轨道的未共享电子对的挤压和重叠降到最低

应常会限制 ϕ 角只能取三种可能交错构象中的一种。另外，对 1-6 连键而言，还须考虑 ω 角。在三个可能呈现交错构象的 ω 角中，有一个因 O5 和 O6 不能接受的靠近，而常产生空间碰撞，故只能观察到 ω=60° 和 +180° 两种构象（图 7.6）。

除将糖原子当做硬球考虑外，还可以采用更为现实的方法来表现糖原子是如何相互作用的，即在两原子互相靠近时首先形成有利的相互作用，直到其紧密靠近而导致负相互作用。同样，外 - 端基异构效应并不会限制 ϕ 为单一的角度值，而是根据其接近最适 ϕ 值的不同程度形成不同的能量贡献。利用这些更为精密的能量效应，通过计算不同扭角组合对应的能量数值，还可以在扭角标绘图上绘制成系列等高线能量图（图 7.7）。糖苷键的能量等高线图可以揭示相对较浅的能量极小值。其中常有几个能量差别很小的局部极小值。对各种糖苷键观察到的扭角，一般都落在能量等高线极小值的附近。

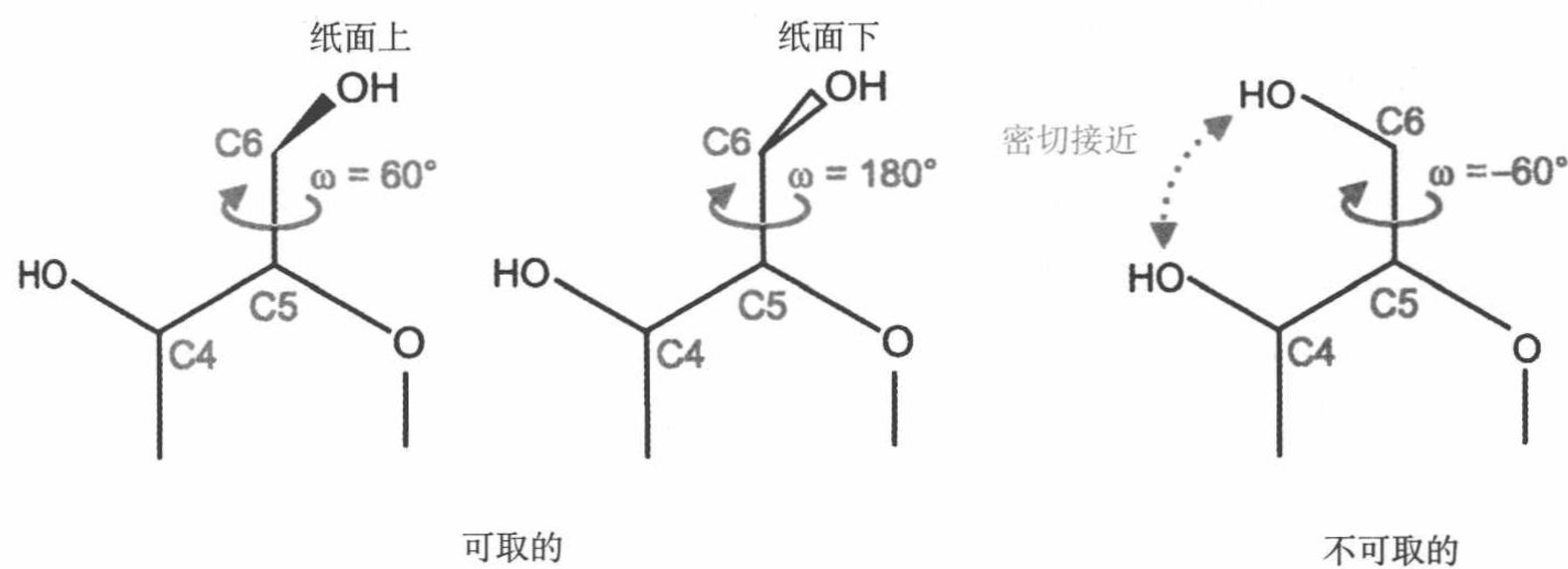


图 7.6　ω 角构象的约束在可以产生交错构象的三个 ω 角中，一个（ω= –60°）的角，因为其 C4 和 C6 的羟基紧密相连，而成为不可取的 ω 角

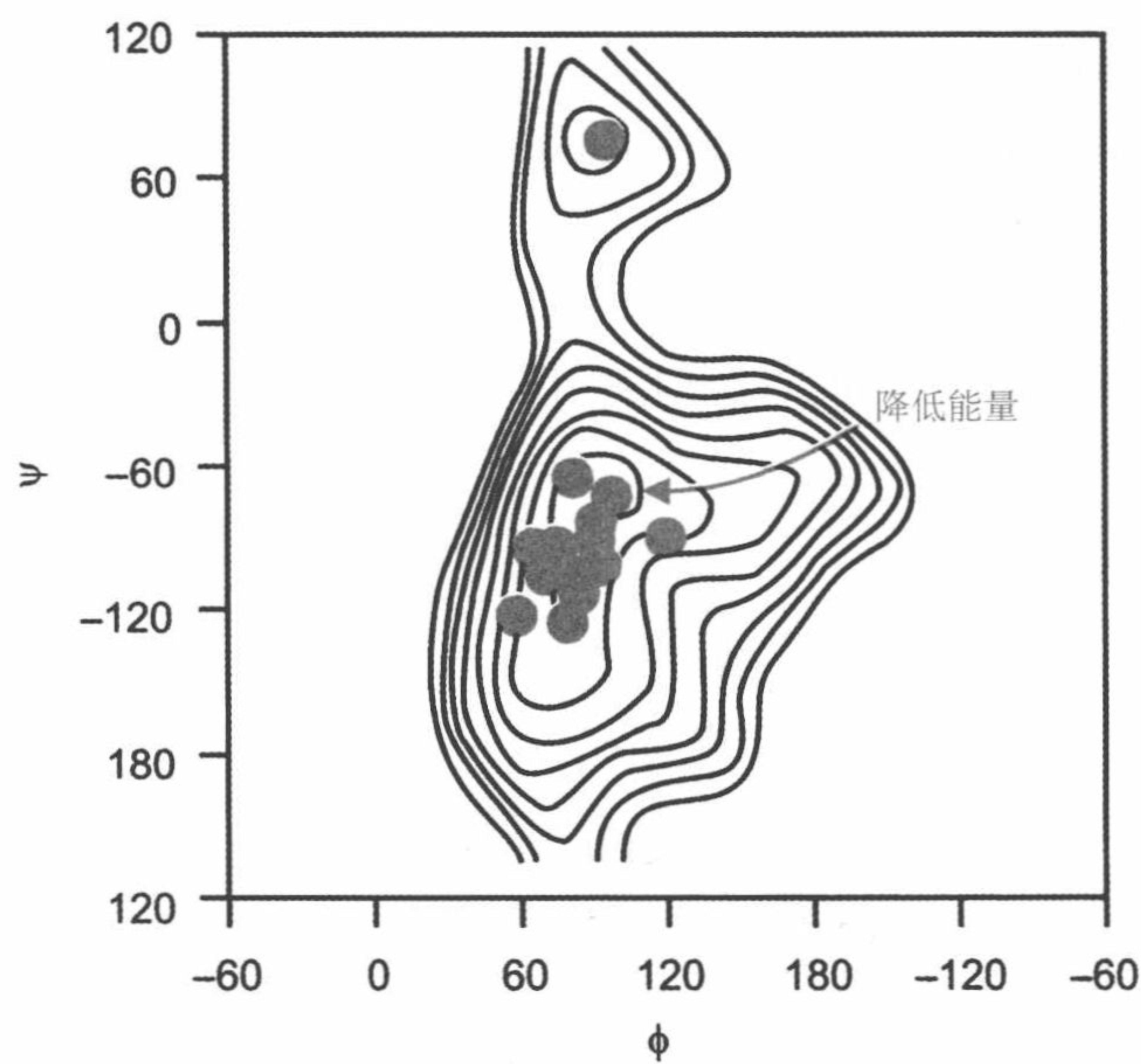


图 7.7　Manα1-3Man 二糖能量等高线图。图中所示为一级和二级能量极小值。从标志符号可以看出，实验观察到的构象大多落在一级能量极小值，但也能看到与二级能量极小值相关的构象 [引自 :Imberty, A. (1997) Oligosaccharide structure: theory versus experiment. Current Opinion in Structural Biology 7,617-623.]

7.5　共价结构中己糖间彼此远隔的相互作用影响寡糖构象

刚性己糖环、外 - 端基异构效应和位阻等因素，虽然意味着对大多数糖苷键而言，只有少数几种构象是可取的，但是，扭角并未被这些因素精确地固定。结构分析表明，对特定的连键来说，扭角的变动范围通常为 30 ~ 40°。这些微小差别的累积效应，甚至对相同的聚糖，也会产生不同的整体构象。

因此寡糖和多糖的整体构象是由糖苷键的局部约束和共价结构中糖残基彼此间远隔的相互作用联合决定的。当非相邻（被一个或多个插入残基隔开）己糖残基间的空间冲突使所对应的扭角组合无法在寡糖中实现时，这些相互作用可能是不利的。聚糖中荷负电基团之间的静电斥力，例如唾液酸的羧基，也可能对构象产生影响。另一方面，氢键和疏水性有利的相互作用对个别选定糖苷键的构象具有稳定作用。糖残基中的羟基可能成为氢键的供体和接纳体，而环氧，则是氢键潜在的接纳体。在 Manα1-2Man 连键中相邻的单糖残基之间可以直接形成氢键（图 7.8），另有一些情况，氢键还涉及水分子的介入。相邻或相隔更远些残基之间的范德瓦尔斯相互作用对构象也有稳定作用（图 7.9）。这些相关联系部分地反映己糖的两亲特性，其中，B 面常有一定的疏水性，因为它的极性羟基取向或处于平伏位置，或者朝上面向对面。这些相互作用类似于蛋白质中形成疏水核心

➲有关 Lewis^{X} 三糖的功能参见 9.6 节和 9.7 节。

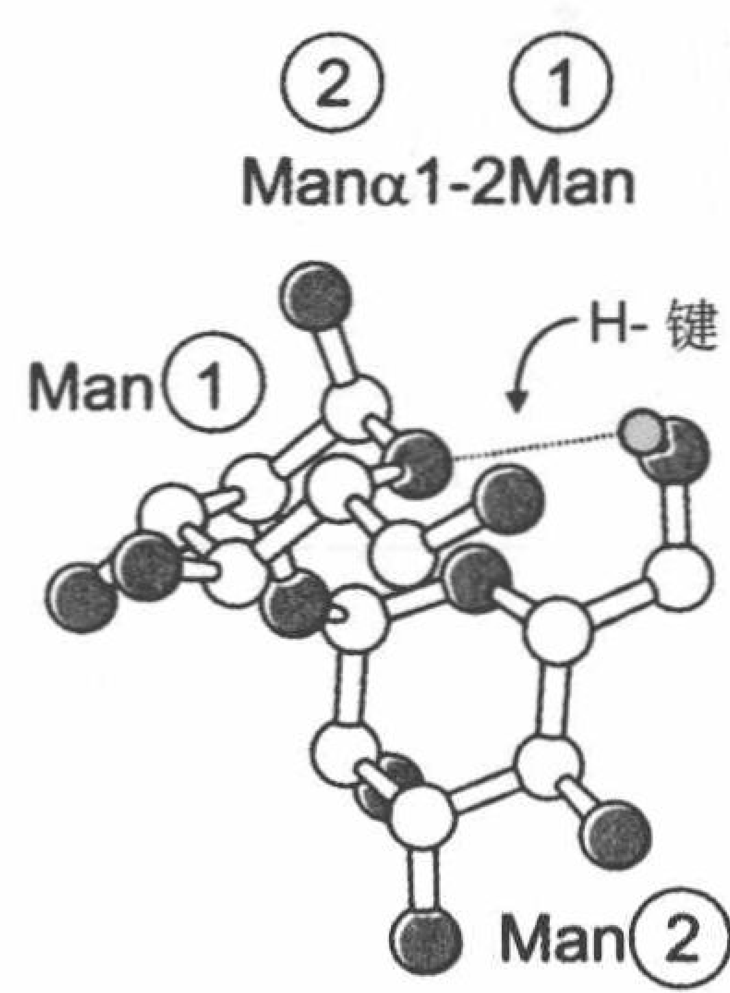


图 7.8　氢键对糖苷键特异构象的稳定作用。Manα1-2Man 二糖的一种优先的构象，因在非还原性甘露糖残基的 O6 和还原性甘露糖残基的环氧之间形成了能量上有利的氢键（根据蛋白质数据库 3P5F 条）

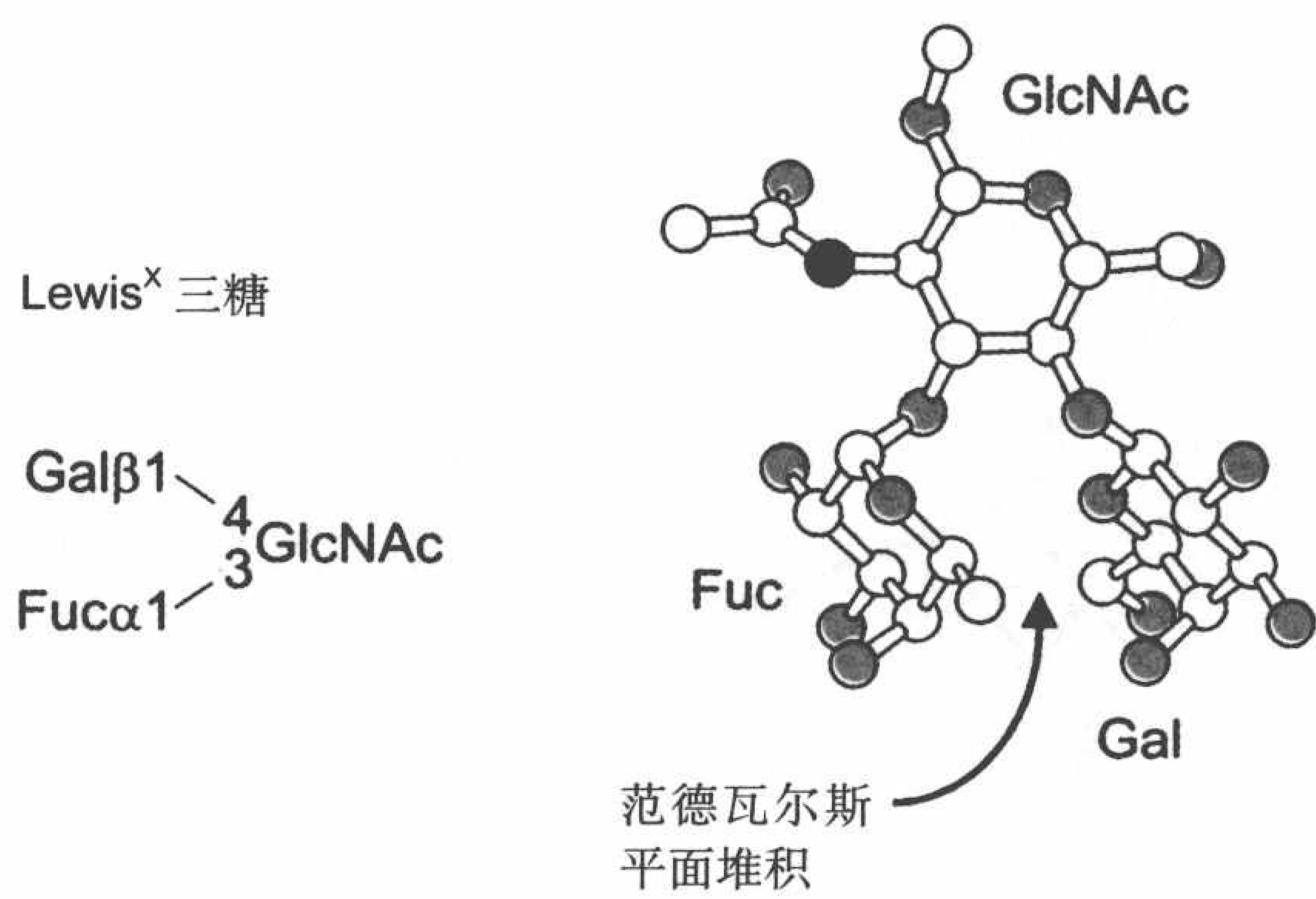


图 7.9 小型寡糖中单糖非极性面之间的疏水性堆积。图中所示的支链三糖的优先构象被非还原端两残基的非极性部分相互作用所稳定。（根据蛋白质数据库 2KMB 条）

的相互作用。但这些相互作用，部分地因为己糖的刚性和几近似平面的特性，只出现在局部的基础上。

7.6 协同相互作用决定寡糖的总体折叠

虽然对大多数糖苷键而言都存在一些优先构象，但从这些备选角度中选出特定的角并不完全取决于连键两侧的糖。协同作用选定寡糖的最终构象可以设想为是一种合作性事件。多个糖苷键中对一组扭角组合的选定，是因为通过这一组合产生相互作用的总数最为有利。这一原理与决定蛋白质最佳折叠的原理相同。但是，大多数寡糖分子都比较小，这意味着反映优选构象中有利作用总数的协同性程度通常小于蛋白质结构域。具有特定折叠的蛋白质模件，一般由 50 个或更多氨基酸残基组成，而典型的 N- 连接聚糖所含糖残基少于 20 个。对多数寡糖而言，其最适折叠构象对应的能量水平远不及蛋白质模件，更像是短肽能量水平。结果使得共价结构完全相同的寡糖，可能有不同的构象（图 7.10）。多数情况下，扭角的微小变化引发了构象的多样性，但有些时候个别扭角的较大变化最终也会导致整体构象的巨大变化。这些结果也说明，聚糖的构象并不是单独地由其共价结构决定。聚糖与结合其蛋白质表面间的相互作用，也会影响许多选定的聚糖构象。

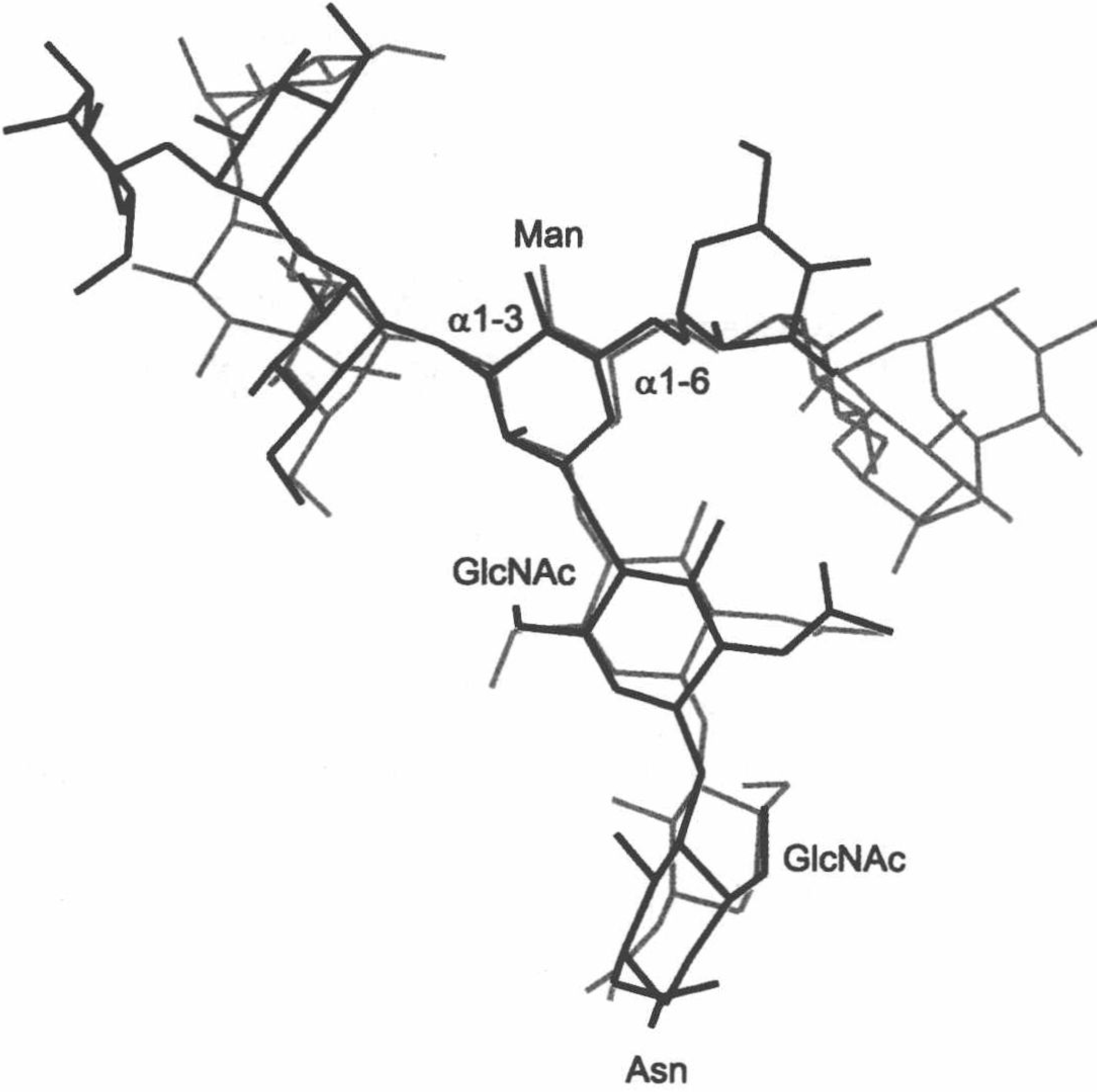


图 7.10 由糖蛋白晶体 X 射线衍射得到的高甘露糖型 N- 连接聚糖构象。重叠部分表明扭角的微小变化及较大构象差异（引自 Petrescu,A.J., Petrescu,S.M., Dwek,R.A., Wormald,M.R.(1999) A statistical analysis of N-and O-glycan linkage conformations from crystallographic data. Glycobiology 9,343-352.）

7.7 寡糖构象是动态的

多数聚糖优先构象，其能量弱稳定性的另一后果表现为动态结构。通过聚糖单个原子间热运动力的分子力学计算可以研讨构象的动力学。在这种情况下，糖苷键可能转动、超越等高线图上的能垒、和采取不同的构象。有些聚糖会取得稳定的最终构象，但另一些则在两组可能的扭角之间继续翻转，说明这两组扭角呈现构象的能量相差很小，高能垒也不能把它们分隔开。这两种构象可以混合平衡的方式共存。已经证明聚糖是动态的，因此可以认为他们是以相关构象的集合或整体组合而存在的。

7.8 由近程和远程相互作用决定多糖构象

决定寡糖构象的原则同样也适用于较大的多糖构象。通过多糖链中相邻残基或远隔残基间的相互作用决定优选的扭角。在由重复的糖残基，以相同连键连接成的长聚糖链中，可多次反复出现特定的 ϕ 和 ψ 角组合。可以用 α1-4 连接的葡萄糖同聚体直链淀粉来说明优选扭角的累积效应（图 7.11）。直链淀粉的 α 连键导致形成由相邻残基间连接的氢键稳定的弯曲构象（bent conformation）。当这一优选扭角在每一个糖苷键上重复出现时，糖链便会形成螺旋。

类似的作用模式分析也适用其他章节所讨论的另一些多糖同聚体。例如，形成大部分微生物外壁的甘露聚糖是由甘露糖以 α1-2 糖苷键连接而成的重复聚合体。由相邻残基间的局部相互作用决定选取哪一种扭角，而这些扭角在各糖苷键中的重复出现则导致螺旋的形成（图 7.12）。非相邻残基间的另一些氢键也会对螺旋起稳定作用。多唾液酸是另一种出现在细菌和哺乳动物细胞表面的同聚体。羧基间的静电排斥作用促成了这些链的延伸螺旋构象的形成。由两种残基交替形成的简单共聚物，例如，出现在蛋白聚糖中的糖胺聚糖构象，很可能同样也遵循这一原则。

➲有关多唾液酸参见 12.7 节。

➲有关糖胺聚糖参见 3.5 节。

7.9 多糖构象界定细胞壁的性质

细胞壁中的多糖主要成分是纤维素，这是一种由 β1-4 键连接的葡萄糖残基组成的重复多聚体。前一节讨论的多聚体中较为弯曲的 α 连键有利于螺旋结构的形成，而 β 连键则导致形成较为延伸的结构（图 7.12）。空间位阻效应加上相邻残基间氢键的形成优先扭角。每一葡糖残基对其相邻残基旋转 180°，交叉排列而形成延伸平直的条形链。残基间的氢键使此结构具有刚性。集聚在一起的多糖链可进一步形成纤维素微原纤维结晶，首先依靠多糖链之间的氢键形成片层，再由多个片层堆积而成。堆积方式的细微差别可以产生不同形式的纤维素，但对任何纤维素而言，多糖平面键的堆积都是由范德瓦尔斯作用力来稳定的。由延伸的多糖链到堆积的多糖片层，进而形成纤维素微原纤维，与由延伸的多肽链形成 β 片层，并进一步形成蚕丝纤维的过程十分相似，这有助于阐明多糖结构中的局部空间限制如何影响两纤维素的宏观性能。

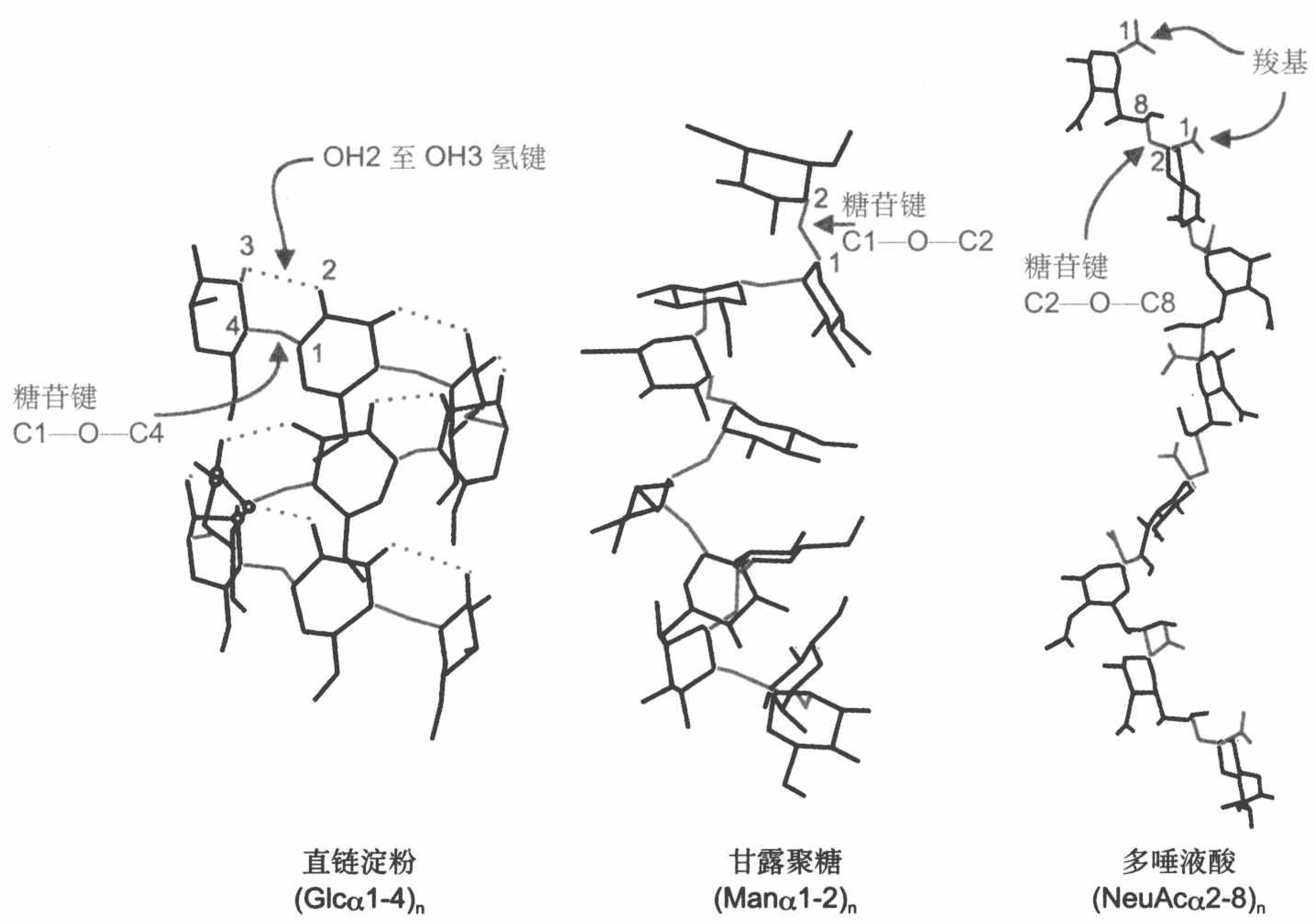


图 7.11　线形多糖同聚体中螺旋的形成。植物中的直链淀粉是储积葡萄糖的多糖。相邻糖残基间的氢键对一种构象有利。相同连键的重复产生螺旋结构。另一些多聚体中优选的连键构象形成的螺旋螺距不同。图中另外两个例子是：在白色假丝酵母（Candida albicans）外壁发现的甘露聚糖结构和在哺乳动物和微生物细胞表面发现的多唾液酸（直链淀粉结构摘自：Winterburn, P.J., Polysaccharide structure and function , in A.T. Bull, J.R., Lagnao, J.O. Thomas, and K.F. Tipton, eds, *Companion to Biochemistry: Selected Topics for Further Study* (London: Longman，1974), 307-341. 甘露聚糖结构摘自：Nitz, M., Ling, C.-C., Otter, A., Cutler, J.E., and Bundle, D.R. (2002).The unique solution structure and immunochemistry of the Candida albicans β-1,2-mannopyran cell wall antigens, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3440-3446. 聚唾液酸结构摘自：Evans, S.V., Sigurskjol, B.W., Jennings, H. J., Brisson, J-R., To, R., Tse, W. C., Altman, E., Forsch, M., Weishberger, C., Kratzin, H. D., Klebert, S., Vaesen, M., Bitter-Suermann , D., Rose, D. R., Young, N.M., and Bundle, D. R.,(1995). Evidence for the extended helical nature of polysaccharide epitopes: the 2.8 Å resolution structure and thermodynamics of ligand binding of an antigen binding fragment specific for β-(2-8)-polysialic acid, *Biochemistry* **34**,6737-6744.）

由微原纤维多糖形成细胞壁纤维，还需要其他类型的多糖，如半纤维素。半纤维素的主要组分是木葡聚糖，与纤维素相似，半纤维素主链为β1，4-连接的葡糖多聚体，但其很多葡糖残基的第 6 位均被木糖所取代。这一取代使得半纤维素难以形成纤维样集聚，但其部分主链仍能与纤维素微原纤

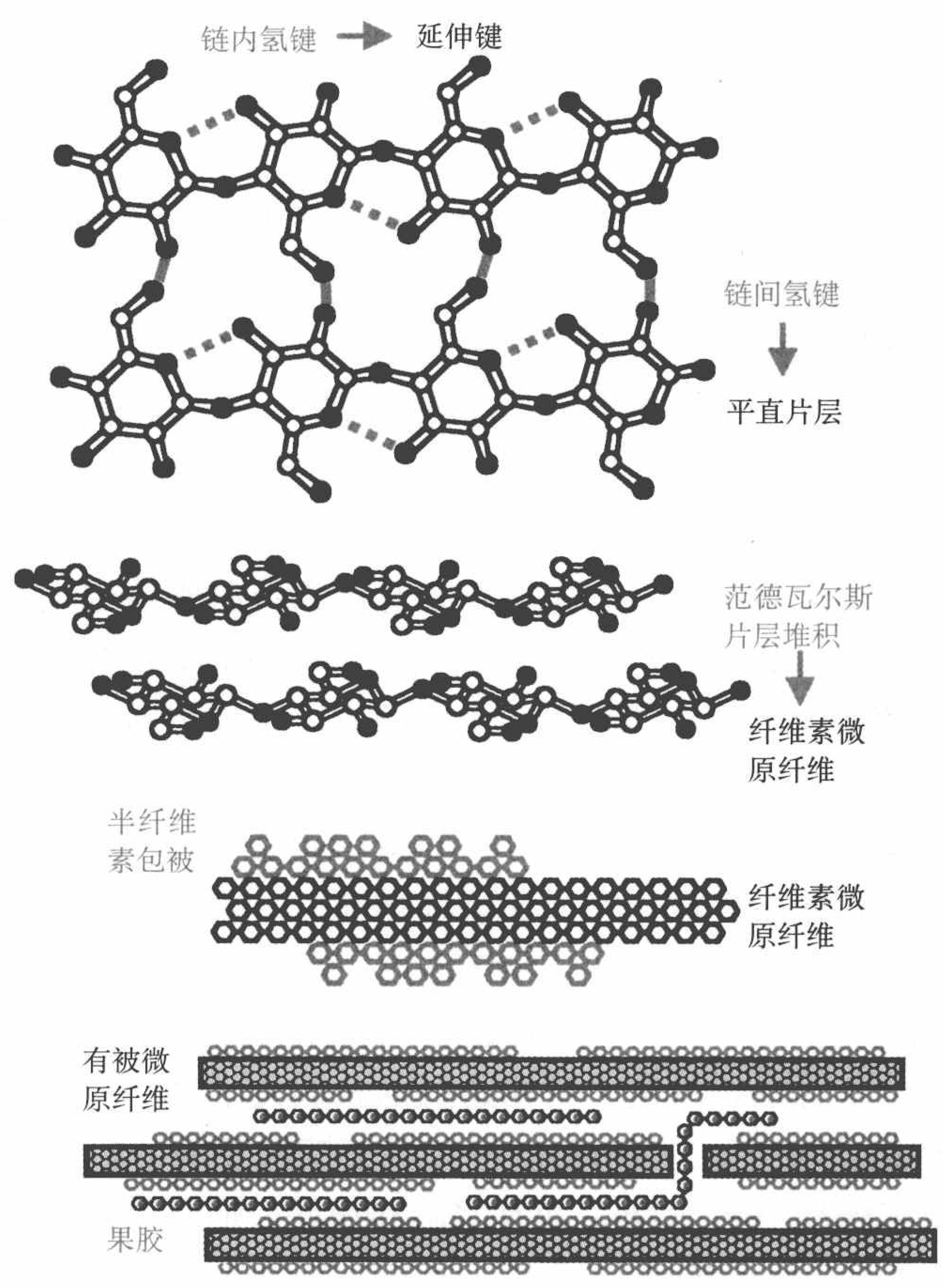


图 7.12 植物细胞壁中含 β- 连接残基的多糖延伸构象。葡萄糖残基和链内、链间氢键之间的 β- 连键的优选构象，通过范德瓦尔斯相互作用，形成纤维素微原纤维，稳定堆积的片层。与其他多聚体，例如，半纤维素和果胶的相互作用，可保持微原纤维在适当位置

维相互作用，并包被进入纤维集聚，但是主链多聚体部分仍能与纤维素微原纤维相互作用和包被微原纤维表面。不太齐整的半纤维素结构使其可以桥连纤维素微原纤维，进而实现三维空间内的组织和排列。线形排列的微原纤维能有效地抗拒长度方向的拉力，因为所有共价纤维素多聚体都并行于这一方向。而且细胞壁中纤维素还可以十字形交叉形成层积，由此提供了多维度的抗拉强度。另外，一些人们所熟知的酸性多糖，如果胶，填充于微原纤维间的空隙，从而使得这些微原纤维更紧密地联结在一起。这些多聚体与动物组织中的糖胺聚糖一样，可能在细胞壁的水合作用中发挥一定的作用。另外，果胶的片段还可以作为信号传导送分子。

➡有关植物的信号传送分子参见 11.3 节。

7.10 采用 X 射线晶体学和核磁共振技术分析少数寡糖构象

分析聚糖构象可以利用的主要工具是 X 射线晶体术和核磁共振（NMR）波谱术。只有极少数的寡糖可以采用结晶方法分离，而且，也只分析过数目很少的连接于蛋白质的聚糖晶体结构。从晶体学实验之所以很难获得聚糖构象的原因之一是，在努力消除异质性时，常需从糖蛋白上除去聚糖。遗憾的是，这一获取聚糖的策略失去了认知糖蛋白寡糖部分构象的可能性。当完整的糖蛋白以晶体形式存在时，其连接聚糖的共价结构异质性，以及构象经常导致电子密度图像很差，对远离蛋白质结合位点的聚糖部分特别不清晰，尤其是在远离蛋白质结合位点的聚糖部分更加模糊。

晶体结构中观察到的聚糖可能参与了分子间有助于稳定晶格的相互作用。但是，不同结晶环境下，同一聚糖构象的总体相似性，再次证实这些相互作用对聚糖构象无明显干扰。在经分析的蛋白质晶体结构总数以指数增加时，用晶体学分析糖蛋白数也在成比例地增加。尽管如此，用晶体学方法得到的含 5 个或更多残基的 N- 连接聚糖构象还不足 100 个。

像在蛋白质结构分析中一样，NMR 是另一个可以代替 X 射线晶体技术聚糖构象的重要分析方法，从这一方法还可以获取关于聚糖构象在溶液中的补充信息。在某些情况下，NMR 很适合于聚糖构象的分析，因为连接于蛋白质的典型聚糖都小于 5kDa，而且水溶性很好。但是，解析寡糖的 NMR 图谱有些难度。在每个单糖残基内，能产生有用信息的是那些连接碳原子的质子。这些质子几乎全部都处于同样的化学环境，因为大部分碳原子都与另外两个碳原子和一个氧原子连接。因此，可能需要进行多维实验和同位素标记，给寡糖中的各个质子指定专一的 NMR 信号（共振），以便分析完整的结构。

NMR 构象分析方法很大程度上取决于检测两质子空间邻近度的核奥弗豪泽效应（nuclear Overhauser effect, NOE）。由于在小于 5 Å（含）的可检测范围内只有几对质子，两个糖基之间的彼此相对的取向通常由极少数 NOE 信号存在与否来决定（图 7.13）。尽管存在着这些困难，已经用 NMR 方法分析了约 20 多个聚糖构象，其中有一些还是结合着蛋白质的聚糖构象。

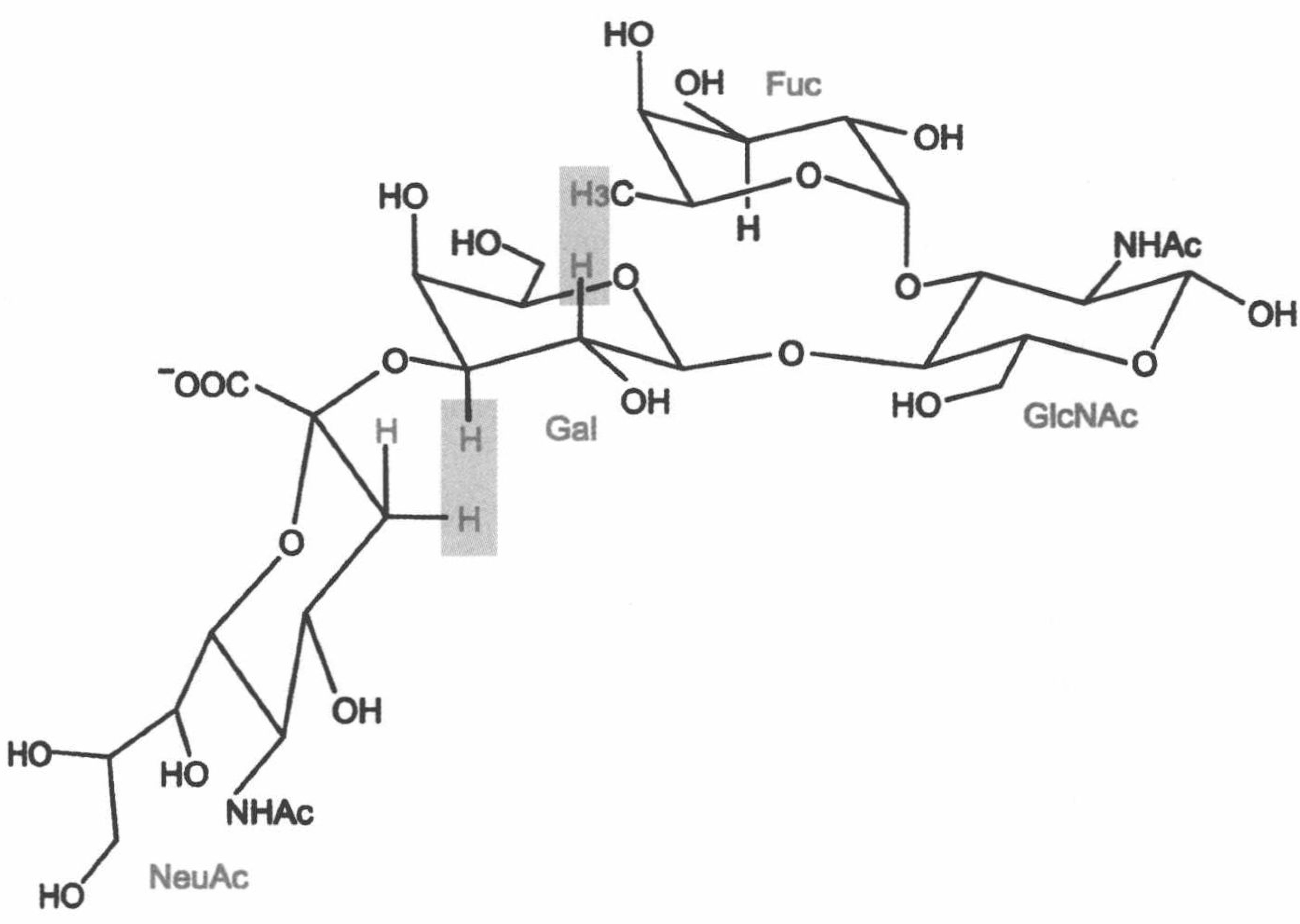


图 7.13　图中举例说明如何通过核奥弗豪泽作用确定质子间距离，从而进一步分析寡糖的几何性质。突出表示质子之间的相互作用显示岩藻糖和半乳糖残基的配置，并界定唾液酸残基相对于半乳糖残基的位置 [摘自 Lin, Y.-C., Hummel, C.W., Huang, D.-H., Ichikawa, Y., Nicolaou, K. C., and Wong, C.-H.(1992). Conformational studies of sialyl Lewis X in aqueous solution, *Journal of the American Chemical Society* **114**, 5452-5454.]

小　结

尽管聚糖的构象分析还存在不少困难，但我们对大部分最常见的 N- 连接聚糖可能的构象已经有了理性认识。虽然同一聚糖在不同条件下可能有不同的构象，但其总体形状并无很大差别。这些结构信息为了解随后各章所讨论的聚糖生物学功能奠定了基础。扩充已有的构象数据库，不仅要建立 N- 连接聚糖构象的，也要建立连接蛋白质和脂质的寡糖构象的数据库，这一切应成为今后主要努力的目标。

主要参考文献

Imberry, A. (1997).Oligosaccharide structures: theory versus experiment,

Current Opinion in structural Biology **7**, 617-623. 这篇论文对现有寡糖构象测定方法进行了评论，并附有一些在生物学上有兴趣的聚糖构象测定的文献资料。

Nitz, M., Ling, C.-C., Otter, A., Cutler, J. E. , and Bundle, D. R. (2002). The unique solution structure and immunochemistry of the *Candida albicans* β-1, 2-mannopyran cell wall antigens, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3440-3446. 这篇文章提出 NMR 实验表明酵母抗原性多糖形式螺旋结构为利用核奥弗豪泽效应 (nuclear overhauser effect, NOE) 测定聚糖构象提供了良好的实例。

Petrescu, A.J., Butters, T.D., Reinkensmeier, G., Petrescu, S. , Platt, F. M. , Dwek, R. A., and Wormald, M.R. (1997).The solution NMR structure of glucosylated N-glycans involved in the early stages of glycoprotein biosynthesis and folding, *EMBO Journal* **16**, 4302-4310. 此论文为以 NMR 测定大型的、对生物学具有重要意义的寡糖构象提供了实例。

Petrescu, A.J., Petrescu, S.M., Dwek, R. A. , and Wormald, M. R. (1999). A statistical analysis of N-and O-glycan linkage conformations from crystallographic data, *Glycobiology* **9**, 343-352. 对所有通过晶体学获得的聚糖构象进行比较，并从中得出形式特殊连键优选构象的一般性结论。

Woods, R.J. (1998).Computational carbohydrate chemistry：what theoretical methods can tellus, *Glycoconjugate Journal* **15**, 209-216. 本文为利用分子动态模拟测定聚糖构象的论述文章。

Wyss, D.F., Choi, J.S., Li, J., Knoppers, M. H. , Willis, K.J., Arulanandam, A. R. N., Smolyar, A., Reinherz, E.L., and Wagner, G. (1995). Conformation and function of the N-linked glycan in the cell adhesion domain of human CD2, *Science* **269**, 1273-1278. 这篇论文是介绍另一种以 NMR 测定寡糖仍与蛋白质结合着的 N- 连接寡糖构象的方法。

习 题

7.1 在如图 7.9 所示的 Lewis^x 寡糖图上，给碳原子编上号，用这一信息推断出哪个面是岩藻糖和半乳糖残基的 B 面，并确定哪些面相互作用对该结构具有稳定作用。

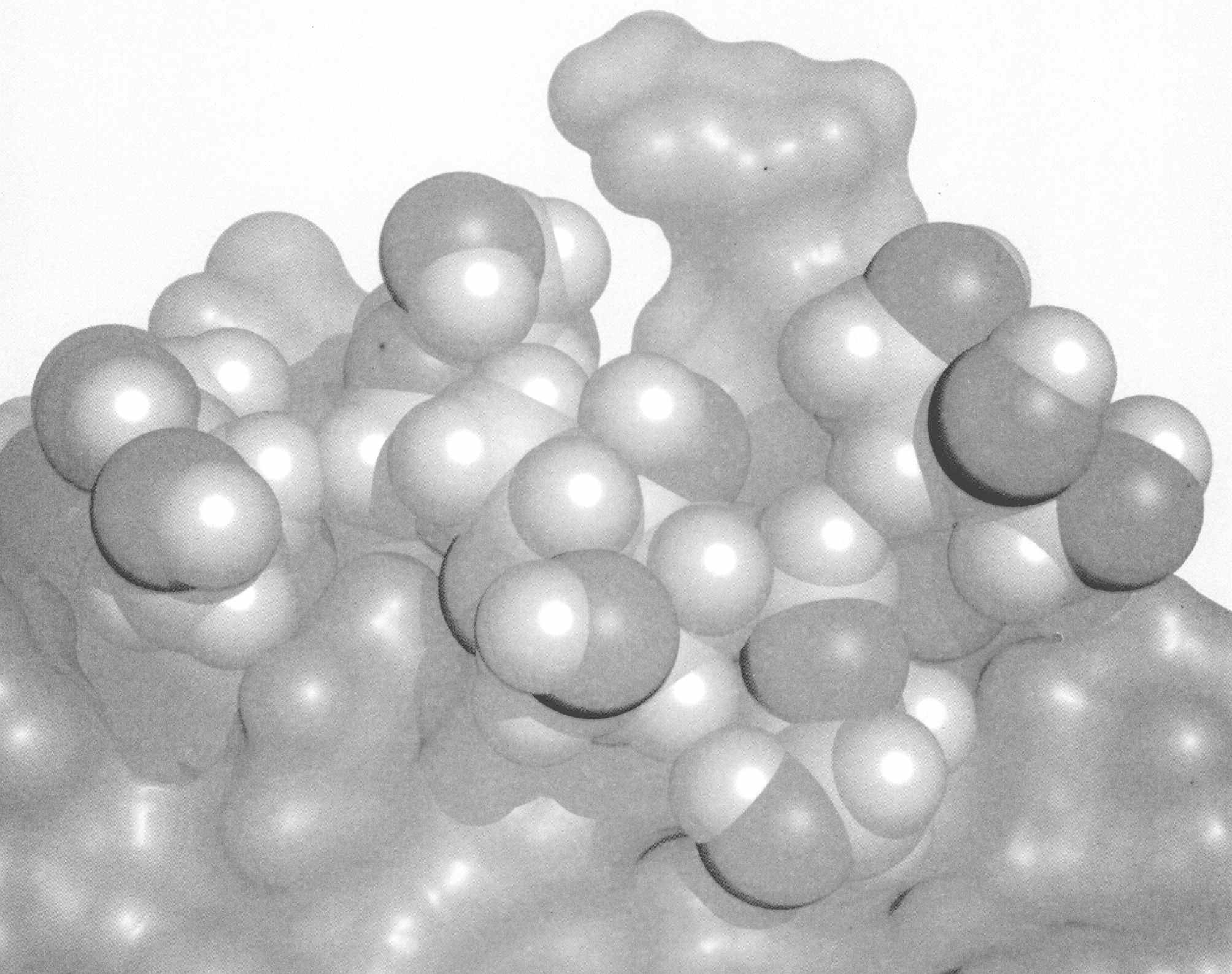
7.2 利用分子模型建构 Glcβ- 4Glc 二糖。将 ϕ 角安排为由外 - 端基异构物效应所导致的优先角，然后用某一残基的羧基 3 与另一残基环氧之间的氢键，将此分子排列成纤维素典型的延伸型 β- 构象。估算这一构象中的 ϕ 角。

7.3 对比纤维素微原纤维中的多糖与蚕丝中蛋白质的分子组织，阐明多聚体构象和连键的形式能使纤维在各方向保持稳定。

7.4 与大部分其他糖的多聚体相比，白色念珠酵母菌外壁的甘露糖多聚体采取了一种不寻常的密致结构。试论采用 NMR 测定邻近度的实验方法如何确定构象，该结构与研发疫苗有何联系？

7.5 本章列出的主要参考文献中，Petrescu 等的论文（1997）提出了用 NMR 方法测定一种具有生物学重要意义的大分子子寡糖构象。此项研究对寡糖中各连键构象提供了哪些信息？从这项研究获得了生物学方面哪些深层认识？

第二部分
生物学中的聚糖



糖基化对蛋白质结构和功能的影响

8

学习目的

学习本章后应知内容：

1. 研究聚糖对蛋白质结构、功能影响的实验方法
2. 聚糖如何影响蛋白质折叠和稳定性
3. 聚糖对蛋白质相互作用的影响

在许多实例中，糖基化对蛋白质和膜的性能有直接的影响，有时还会产生具有重要意义的生物学功能。本章所举实例表明糖基化调控糖蛋白功能的方式通常是影响其稳定性或表面性能。这章的前一部分简要地总结了研究糖基化对蛋白质结构和功能影响的实验方法。

8.1 研究糖基化影响的各种方法

可以采用改变糖基化的方式研究结合蛋白质聚糖的功能，并能确定影响所在。这种实验可分别在不同层次上进行解析：如从蛋白质所有结合位点上消除全部聚糖、消除特异结合位点的糖，或者清除糖结构的某些部分。用三氟甲烷磺酸或无水氟化氢处理可以完全清除糖蛋白上的N-连接聚糖。除了难以保证糖的定量释放外，这一方法的主要问题是在多肽链偶然断裂下对蛋白质的破坏，和在严厉条件下折叠结构可能全面变性。情况虽然如此，但不能把处理所导致的功能丧失全都归因为糖的清除。

幸好现在还有其他消除N-连接糖的方法（图8.1）。肽-N-连接聚糖酶（PNGase）或内切糖苷酶（endoglycosidase）中有一种可以在非变性条件下清除糖，尽管糖蛋白中有些聚糖只在折叠结构被破坏时才能与这些酶接触。当蛋白质从培养细胞分离时，有时可以用衣霉素（tunicamycin）糖

基转移酶抑制剂来抑制多萜醇连接寡糖形成中的第一步，防止过早地出现糖基化反应。另外，蛋白质可以在缺失重要糖基转移酶或糖苷酶的细胞中表达。也有少数例子，对于由糖基化和未糖基化形式混合物组成的组织中分离的蛋白质也可以进行分离和研究。

上述方法可以同时探查在同一时间结合蛋白质的所有聚糖。另有一些方法可用于检测特异位点结合蛋白质聚糖的影响。改变蛋白质糖基化靶序列的定位诱变，使研究个别聚糖的影响成为可能。例如，通过改变天冬酰胺残基，或者改变丝氨酸或苏氨酸侧链的两残基，可以消除特定位点的N-连接糖基化。

可以用外切糖苷酶检测聚糖链中单个糖的作用。这一方法对证实末端唾液酸残基的重要性特别有用，因为唾液酸酶（神经氨酸酶）对仍与蛋白质结合的聚糖产生影响。遗憾的是很少其他的糖苷酶能起这种作用，而且多数糖苷酶对共价连接蛋白质的聚糖不起作用。因为许多蛋白质都是非均一性糖基化，理论上应该可以分开和比较不同糖形的活性。但实际上很难大规模地进行这种分离实验。蛋白质可以在转染组织培养细胞中表达，缺少特异转移酶和聚糖加工酶的突变细胞系可以用于生产改变聚糖的蛋白质。例如，通常采用中国仓鼠卵巢细胞Lec1细胞系生产只含有高甘露型N-连接寡糖，代替复合聚糖的糖蛋白。

➲有关突变细胞系参见5.7节。

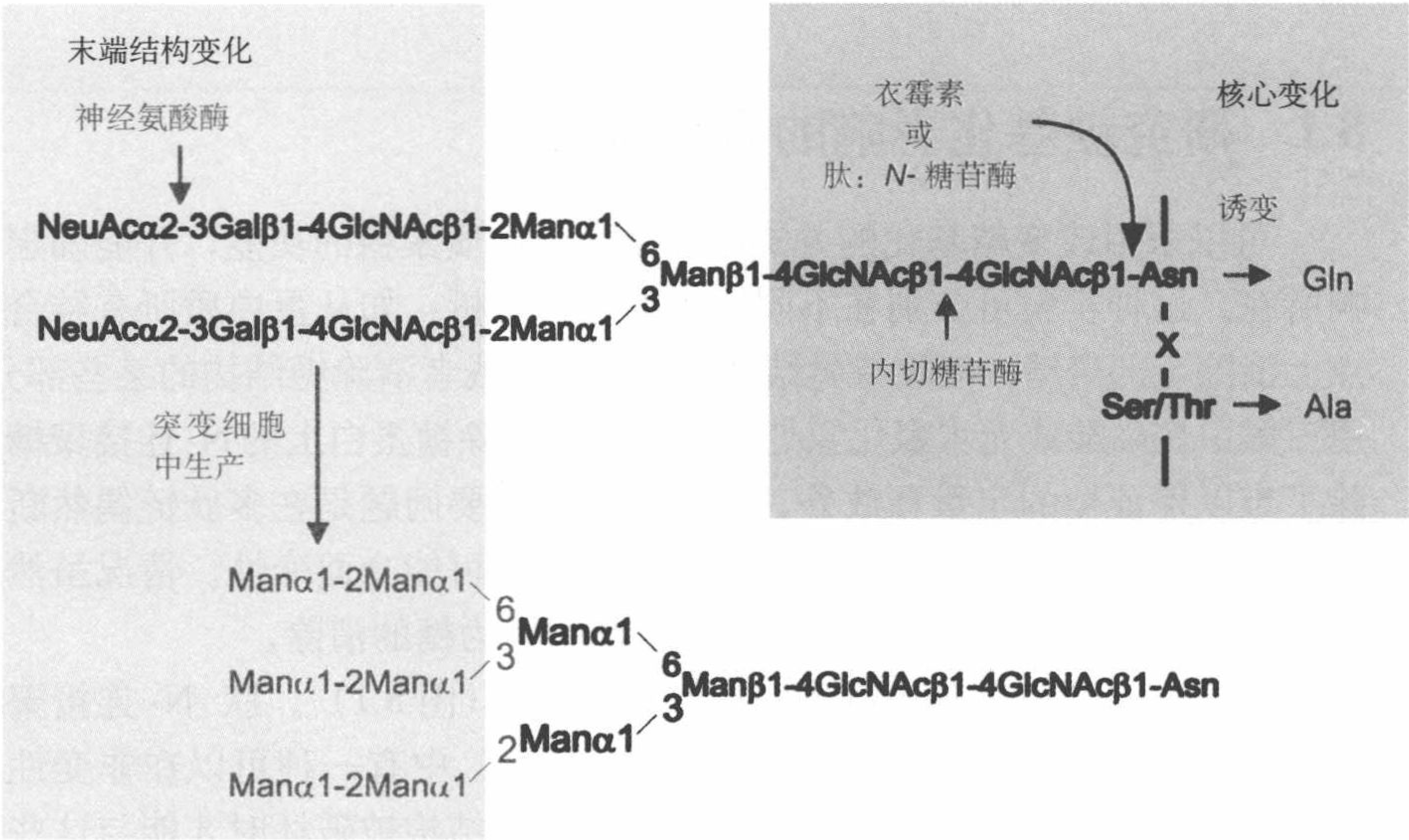


图8.1 缺失某些或全部N-连接寡糖糖蛋白的制备方法

虽然有不少关于检验糖蛋白中个别糖残基重要性假说方面的技术，但这些方法不像多肽定位诱变那样具有专一性。对这些方法必须灵活应用，谨慎解释。这样的考虑是因为，相对而言，还鲜有实例能够使我们在分子基础上详细了解某一特定聚糖是如何赋予糖蛋白专一性生物学性能的。

8.2 保持细胞黏附分子 CD2 结构稳定的糖类

CD2 是杀伤性 T 淋巴细胞表面介导靶细胞结合的细胞黏附分子。CD2 多肽胞外部分由 C 端膜锚与膜连接的免疫球蛋白超家族两结构域组成（图 8.2）。靶细胞上人 CD58 和小鼠 CD48 这两个 CD2 反受体（counter receptor）具有相同的整体域组织和由 N 端免疫球蛋白型结构域间相互作用产生的细胞黏附。

CD2 有 3 个 N- 连接糖基化位点，两个免疫球蛋白域各有一个位点，另一位点位于结构域间的接头序列。已用几种技术证实人 CD2 糖基化对其生物学功能是不可缺少的。用 PNGase 处理 CD2 清除全部 N- 连接糖，则导致完全丧失与 CD58 的结合。改变糖基化的 Asn65 为谷氨酰胺，或改变 Thr67 为丙氨酸的 N 端结构域中糖基化位点的突变，也能使结合活性丧失，表明 65 位的 N- 连接糖具有重要作用。结构分析显示这一位点由载有 5~9 个甘露糖单位的高甘露糖型寡糖占据。结果可以得出结论，这一寡糖对 CD2 功能是不可缺少的。

CD2 的 N 端免疫球蛋白型结构域由两个 β 折叠夹层组成。与 CD58 相互作用的表面处于其中一夹层的外表面。令人惊奇的是糖基化位点恰好处于结构域对面另一 β 片层的外表面。因此糖不能在位点部分结合。从大鼠和人 CD2 的对比中可以更深入地了解糖的功能。大鼠 CD2 糖基化位点与人 CD2 糖基化位点的 Asn-65 不一样，这也是大鼠和人蛋白质的一个重要区别。人蛋白质中，位于 61 位、69 位和 71 位的全部赖氨酸残基和 N- 连接聚糖一样都是从分子同一侧突出。这些赖氨酸残基形成一串簇聚的正电荷。在大鼠的同系物中，簇聚的正电荷被 61 位的谷氨酸残基阻断。看起来，人 CD2 糖功能是通过赖氨酸残基的氨基构成氢键来保持簇聚正电荷稳定。大鼠 CD2 的情况不同，由于 61 位的负电荷侧链，大鼠 CD2 不需要这样的稳定作用。因为 61 位的赖氨酸被谷氨酸取代，即使 65 位不存在糖基化，人 CD2 仍在起作用。

只需要为首的 3 个聚糖残基就可以稳定 CD2，这种情况与最内部的

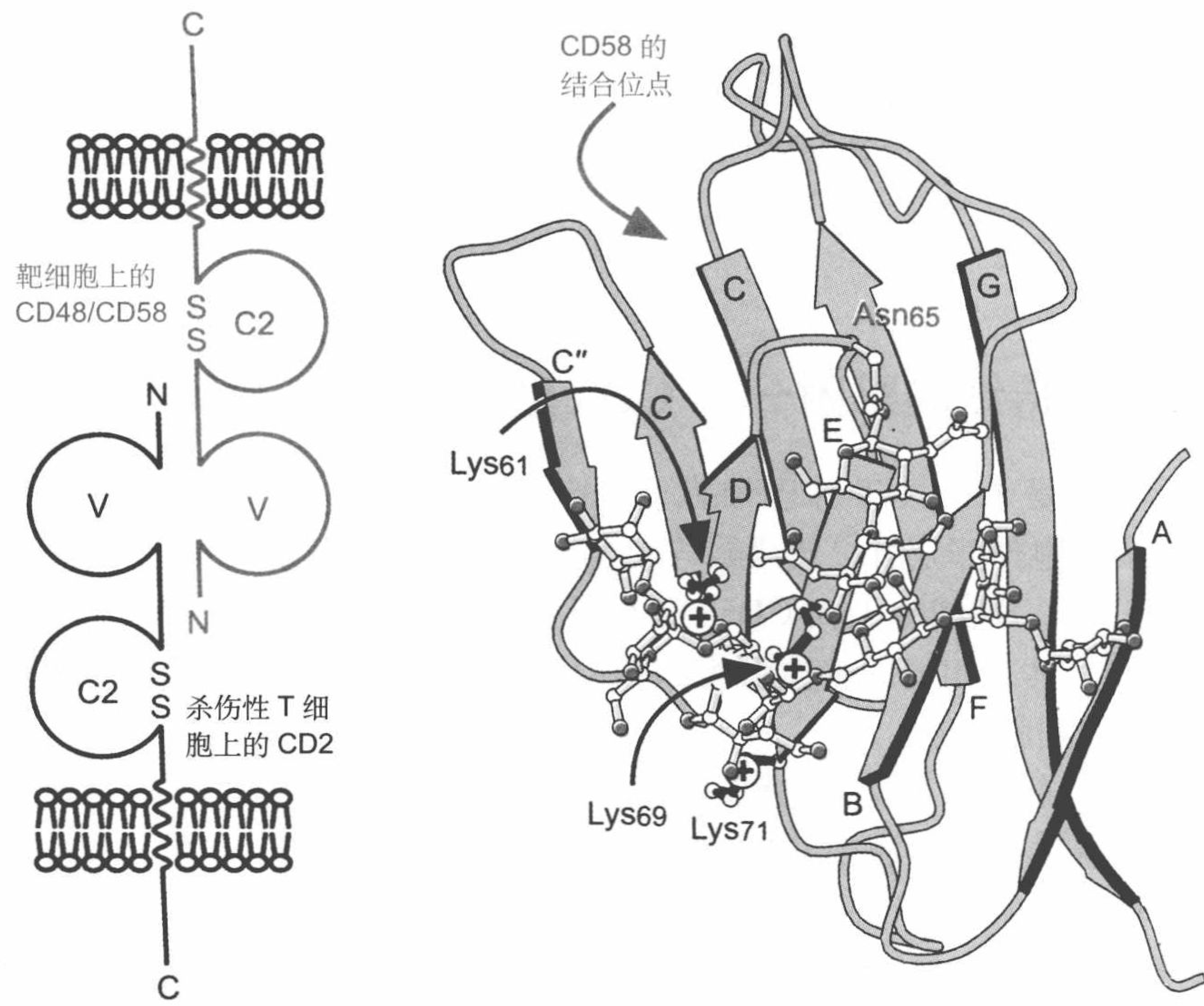


图 8.2　CD2 结构和与反受体 CD48/CD58 的相互作用。胞外各结构域是由两个免疫球蛋白超家族域组成。CD2 的结合位点位于由 C，C′ 链和 F 链加连接环构成的后 β 片层的背面。重要的糖基化位点位于 Asn65 正面的 β 片层（根据蛋白质数据库 IGYA 条目）

甘露糖残基能与赖氨酸残基相互作用，并保持稳定折叠状态的理念相符（图 8.2）。但有时只有第一个 GlcNAc 残基与蛋白质结合，也能使 CD2 保持稳定，所以不能以同样方式解释这种稳定作用。第一个 GlcNAc 残基与天冬酰胺结合产生的稳定作用，通常主要在其他糖蛋白上出现。这一效果可能产生于多肽主链局部的相互作用，糖蛋白稳定性的计算机模型设计表明，糖残基的添加有助于蛋白质折叠的另一可能性是因为不稳定的未折叠状态，而不是稳定的折叠状态（图 8.3）。还不清楚不稳定作用的基础，但很可能是正常情况下糖基团阻止了稳定未折叠多肽的瞬间局部相互作用。

从这些研究中可以得出几点重要结论。研究表明，糖在糖蛋白生物功能中的重要作用并不直接参与介导这一功能。有实例可以说明这一点，糖基化可以稳定蛋白质结构，但不需要糖基化直接参与反受体的相互作用。

另外，大鼠和人蛋白质的对比表明，虽然糖能保持蛋白质结构稳定，但不是保持结构稳定的唯一方式。氨基酸序列中还有其他变通的稳定方法， 如在 61 位以谷氨酸取代赖氨酸，可以形成稳定的未糖基化结构。

8.3 在锥虫多变表面糖蛋白中寡糖置换 α 螺旋

大鼠和人 CD2 代表着对同一结构问题的两种解释；一种是通过糖基化；另一种是通过改变氨基酸。这一最具特点的现象出现在寄生物锥虫(trypanosome)外壳表面的多变表面糖蛋白(variant surface glycoprotein)家族(图 8.4) 。锥虫是活动于众多宿主间的大型单细胞真核生物，能引发人昏睡病。锥虫在其生命周期的主要阶段，可以在循环系统中到处活动。为了生存，锥虫通过对一系列不同外壳蛋白，多变表面糖蛋白的顺序表达逃避宿主的免疫应答。这种多变糖蛋白由一基因大家族编码。这类基因处于强大趋异进化压力之下，致使抗体和杀伤性 T 淋巴细胞与一种变体蛋白产生反应活性，而对另一变体蛋白则不产生活性，当宿主抗体和 T 淋巴细胞开始识别锥虫时，寄生物则转向另一不同的变体表达。这样，寄生物经常保持超前宿主免疫应答一步，从而引发锥虫感染相关的特征性波动式发热。

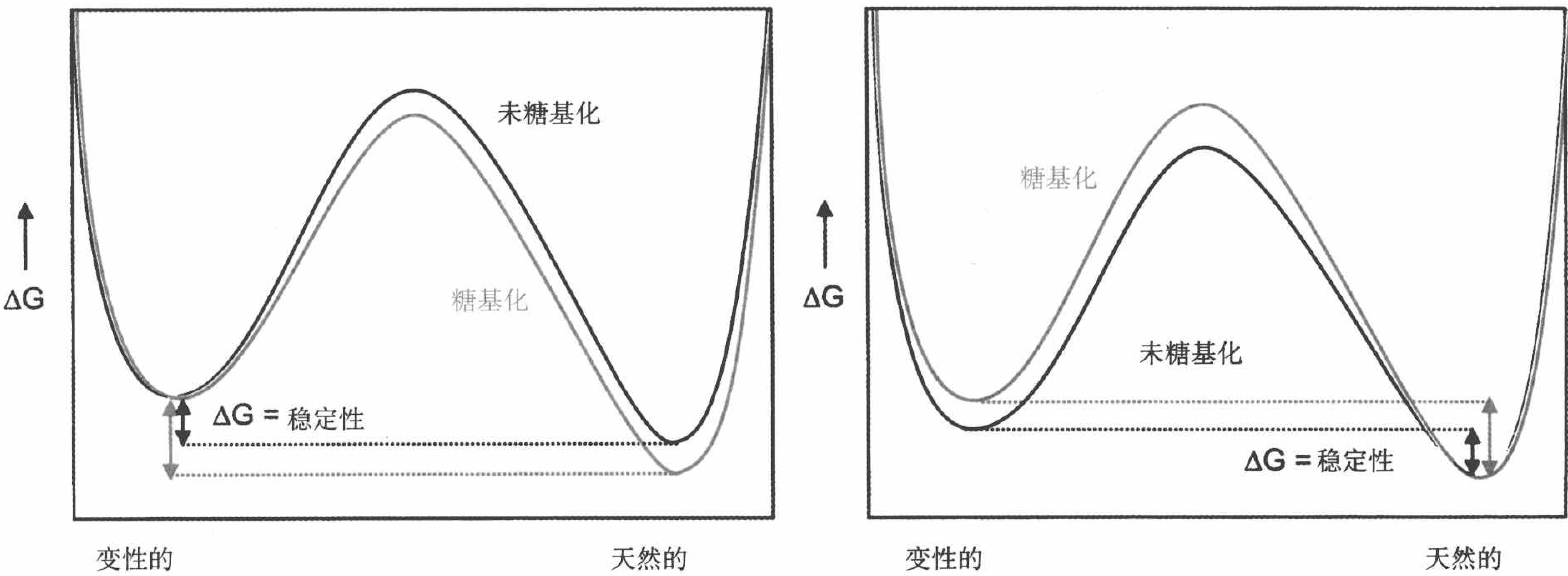


图 8.3 通过糖基化强化蛋白质稳定性的机理。左图表示聚糖与天然折叠蛋白质之间的接触稳定折叠构象状况；右图表示另一种糖基化能使未折叠状态不稳定，使折叠状态更加稳定

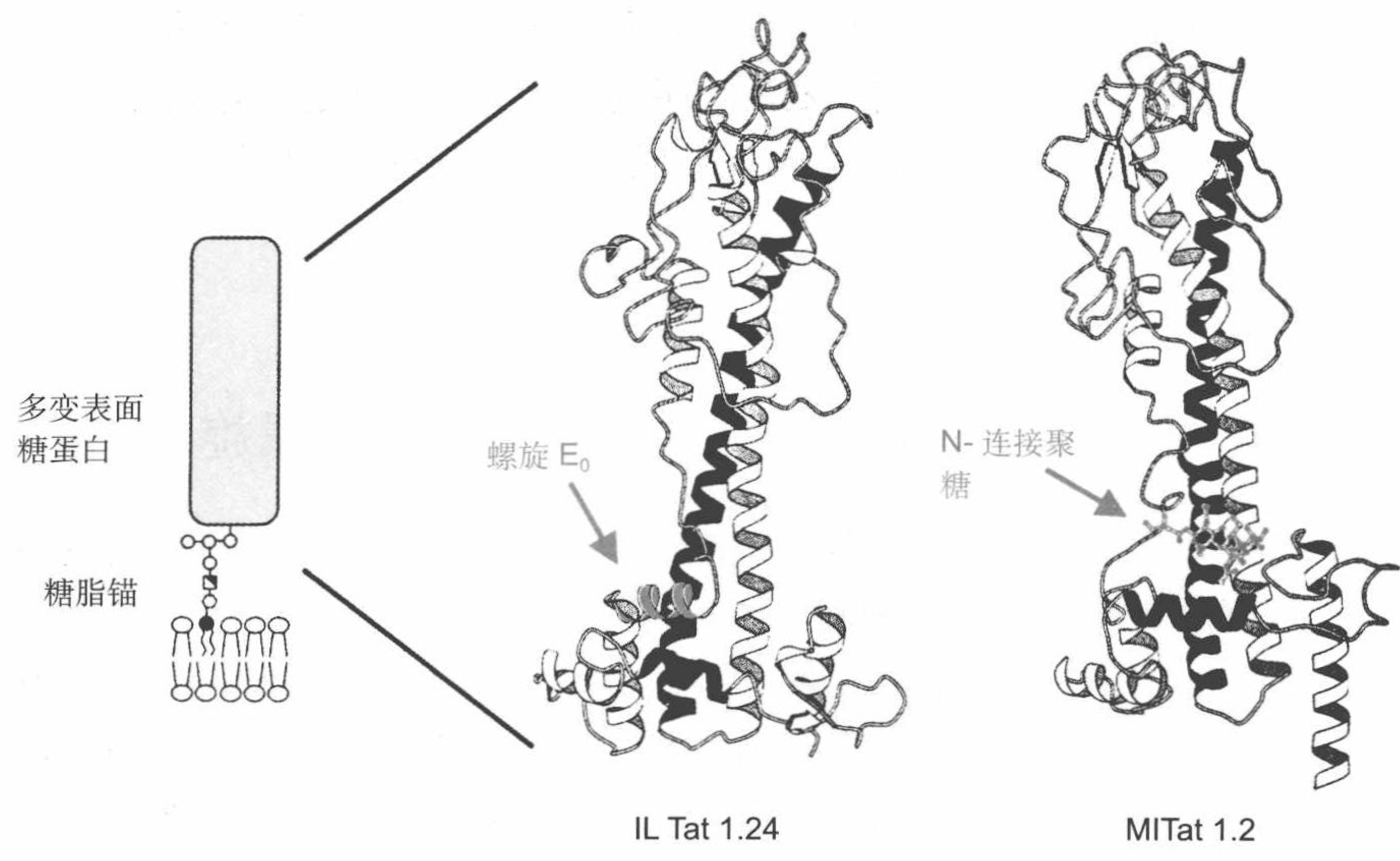


图 8.4 锥虫质膜外侧形成外壳的多变表面糖蛋白两种多变体整体结构类似，但有些细节不同， 如在大分子结构上遮盖疏水膜片的螺旋 E_0 被 N- 连接聚糖取代（根据蛋白质数据库 1VSG 和 2VSG 条目）

锥虫的两种多变表面糖蛋白的胞外结构部分已由 X 射线晶体学阐释清楚。虽然这两种蛋白质只有 16% 的相同序列，但占有相同结构元件的 60%，证实它们的趋异进化过程起源于同一始祖。在基础结构中，变体 MITat1.2 有一个 ILTat1.24 变体所没有的与天冬酰胺连接的高甘露糖寡糖，因为这一序列已经演变，并且必需的 Asn-X-Ser/Thr 序列已不存在。ILTat1.24 变体中在 B 和 H 螺旋交叉区有一个额外突出的短 α 螺旋（螺旋 E0）覆盖着疏水膜片。在 MITat1.2 变体中高甘露糖寡糖掩护着这一膜片，因此，多肽和寡糖节可以单独地解决共同的结构问题。

在CD2和锥虫举例中，令人费解的是糖基化作为稳定特殊结构的工具，单纯的改变氨基酸序列同样可以达到目的。这样的改变并不需要合成寡糖和与蛋白质结合的复杂机构。理解这一明显自相矛盾的论点的关键，是要记得糖基化机构可能尚未进化到能够解决这类结构问题。这种机构一旦建立，就会对所有经过内质网到达细胞表面的蛋白质起作用。如果由于随机突变，出现的注定去质膜蛋白质表面上的 Asn-X-Ser/Thr 序列，必定是糖基化的。进化选择将对形成的糖基化结构起作用。如果糖基化的天冬酰胺有助于稳定蛋白质，进化选择将保留这种稳定作用。

至于锥虫表面糖蛋白的情况，好像在 ILTat1.24 变体的始祖中出现过

糖基化位点，而且其最初的进化适应性可能是中性的。但是，如果进一步的突变是由 E_0 螺旋丧失引起的，寡糖的出现是有利的，而且为了保证继续保留掩护疏水膜片，将取决于正选择性压力。对 CD2 也有同样的争论。因此，这些分子中的寡糖不能行使单独地用氨基酸也不能行使的功能。在现有糖基化机器的背景下，对其他用途具有重要作用 Asn-X-Ser/Thr 序列的天冬酰胺，作为整体被选作（或未被选作）新型寡糖 - 缀合的氨基酸。这一特殊结构单位以不同的方式适用于各种进化过程。

8.4　单糖的结合可能影响蛋白质的动力学

糖基化能以微妙的方式调控蛋白质的动态和稳定性。了解清楚这些影响的基础原理，需要具备有关糖蛋白结构及其未糖基化配对物小型蛋白质的详细知识，因此常把蛋白酶抑制剂这类小型蛋白质当作模型进行研究。例如，从蝗虫中分离的 PMP-C 蛋白酶抑制剂是有 36 个氨基酸的多肽，在 9 位上连接有苏氨酸的单一 O- 连接岩藻糖 (O-linked fucose) 残基。曾经通过对 Thr9 结合岩藻糖和在 Thr9 缺失岩藻糖这两个化学合成多肽结构的对比，对糖基化 PMP-C 抑制剂的影响进行了研究。由核磁共振光谱学测定的这种结构由 3 条不受岩藻糖残基影响的 β 片层链组成（图 8.5）。对局部环境敏感的个别原子化学位移的比较，表明在糖基化和未糖基化抑制剂形式之间唯一的构象区别只在岩藻糖残基的 6Å 之内，包括邻近的氨基酸残基 Thr8 和 Phe10。

从温度对抑制剂稳定性影响的研究中，可以看出这些局部相互作用的功能性后果。未岩藻糖基化蛋白质的变性温度比岩藻糖基化形式的蛋白质约低 20℃，证实岩藻糖的相互作用对折叠形式蛋白质的稳定性有利。多肽主链中酰胺质子重氢交换的检测，可以反映这些原子暴露于溶剂的程度，证实糖局部作用具有长远效果。参与 β 片层链之间氢键键合的残基，表明与重水低速交换。在室温下所有岩藻糖基化酰胺质子的交换速度都低于未岩藻糖基化蛋白质中的质子。

因此，蛋白质是以两种平衡混合物状态存在：一种是 β 片层出现在完全折叠的蛋白质中，另一种是完全未折叠形式，其中的 β 片层是分开的。这一解释充分说明了蛋白质折叠综合的和协作的特性。即使岩藻糖只处于 β 片层的一边，也可以使平衡导向折叠状态。但在岩藻糖残基不存在的情况下，整个结构更多时间都处于未折叠状态。因此，岩藻糖通过局部相互

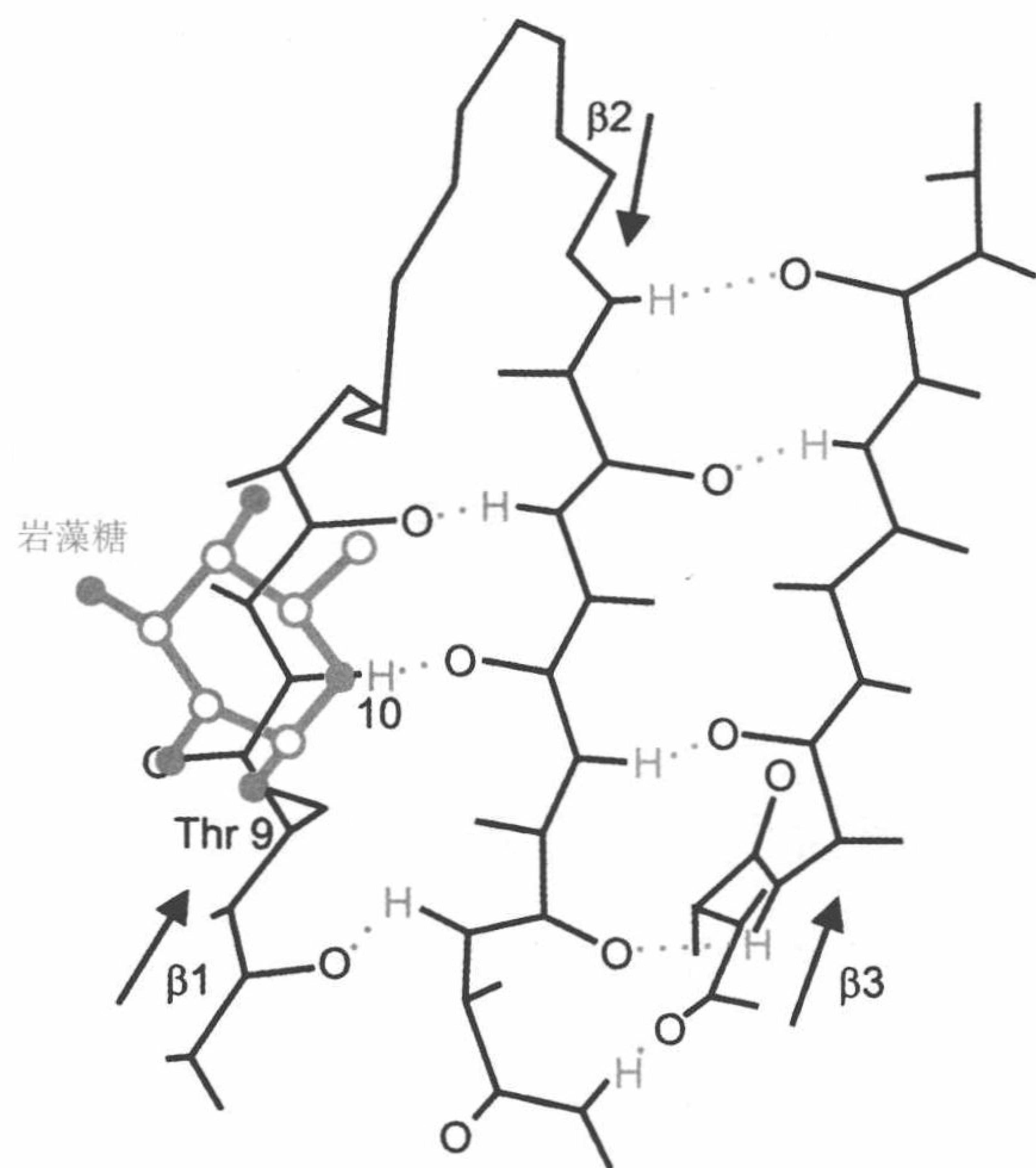


图 8.5 PMP-C 蛋白酶抑制剂 β 片层核心结构。图中重点显示的 β 片层链之间的氢键形成可能降低这些质子的交换速度。苏氨酸残基使整体 β 片层稳定，因此甚至可以降低远离这一结构的质子交换速度

作用使处于远侧 β 片层上的氢键保持稳定，确定整体模件的平衡状态。

8.5 糖基化对免疫球蛋白结合补体和受体能力的影响

抗体的主要功能是通过直接溶解细胞的血清补体蛋白的相互作用和通过与被巨噬细胞摄入的 Fc 受体结合靶向杀死病原体。在 IgG 的补体激活和结合 Fc 受体两种情况下，都需要与形成免疫球蛋白 Fc 部分重链的两 C 端恒定结构域相互作用。在分子的这一部分发现了一个保守的糖基化位点，经不同实验证实，在这一位点，IgG 需要有参与补体激活和结合受体的聚糖。但是，结构分析表明在聚糖与补体成分和与 IgG 结合受体之间很少有，或者并没有直接接触。与 C_H3 结构域结合的聚糖，在内部，而不是在蛋白质表面有一个不寻常的位置，广泛地与 C_H3 和 C_H2 结构域接触（图 8.6）。没有这一聚糖时，这些结构域彼此相向移动，形成与 Fc 受体不能相互作用的构象。

IgG 为糖蛋白的糖基化具有重要的结构性作用提供了实例，因此，在

缺失糖基化的情况下，IgG 的功能将直接受到影响。糖基化的必要性在于防止细菌中产生功能性抗体。但是，经过适当的选择，即使在未糖基化的情况下，还能保留重链变体形式的 IgG 与 Fc 受体结合的能力。还不清楚这些改变对结构的影响，但是，这一发现似乎反映出 CD2 和锥虫多变表面糖蛋白结合的原理，因为利用聚糖侧链，或着多肽链中的氨基酸可以获得同样的特性结构。

8.6　寡糖可能调控蛋白质之间的相互作用

蛋白质表面上的各类糖，对接近小分子底物和配体活性位点和其他结合袋的能力预计不会产生重大影响。但是比较庞大的聚糖取代基可能降低蛋白质向大分子抗体和蛋白酶探针及其他蛋白质趋近的能力。对水溶液中

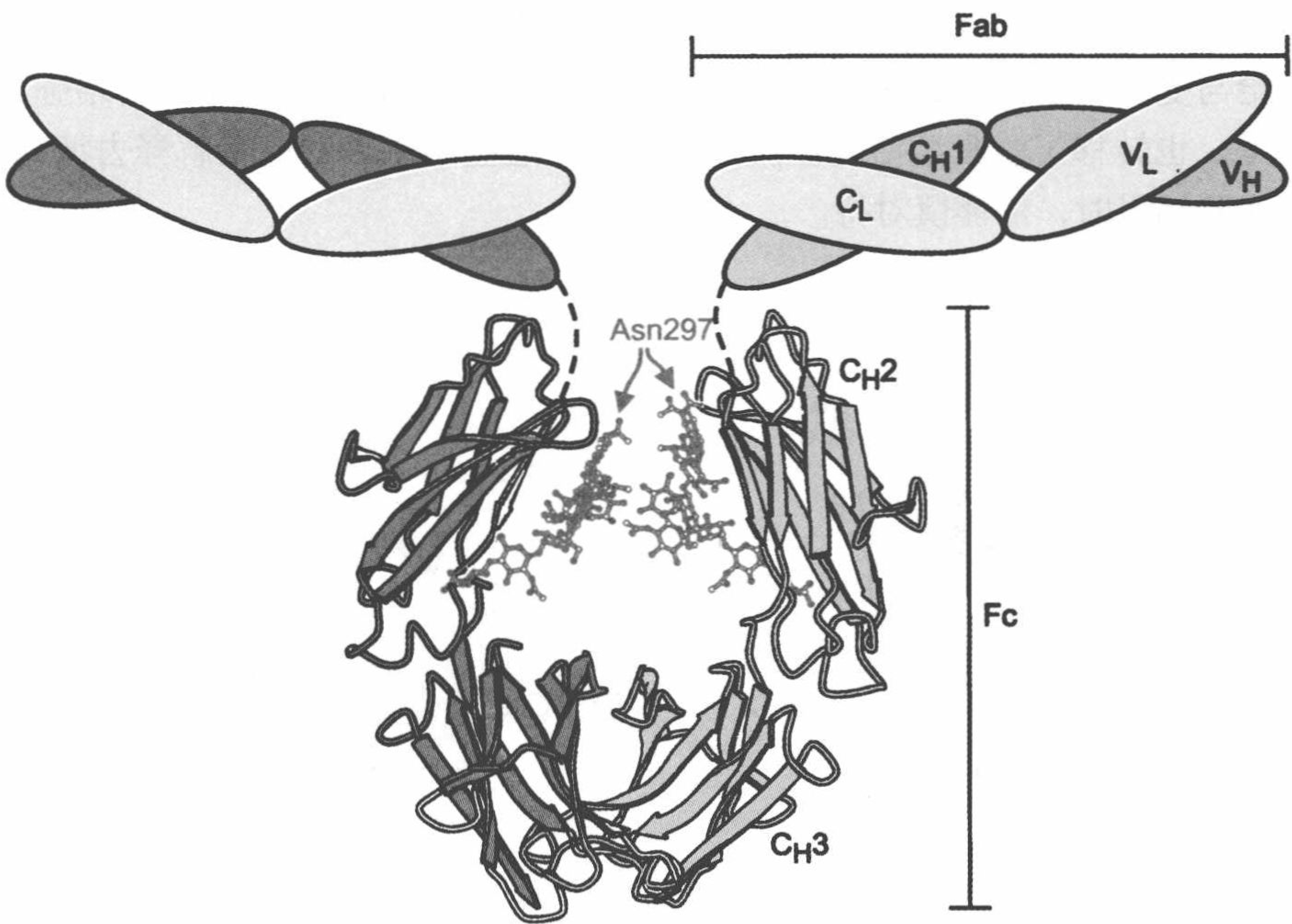


图 8.6　IgG 中 N- 连接聚糖的定位。保守的 IgG 聚糖处于 Fc 区的袋中，导致聚糖隔绝，防止 C_H2 结构域彼此接近（根据蛋白质数据库 1FC1 条目）

蛋白质表面疏水区的屏蔽也能提高溶解度。这一现象常在细菌系统产生的重组蛋白质中出现。这些蛋白质缺失 N- 连接和 O- 连接糖基化，其可溶性也低于产自真核生物表达系统的糖基化对应物。

●有关糖蛋白激素清除参见 **10.9** 节。

蛋白质通过去糖基化或局部糖基化的方式暴露特殊表面，将导致产生意外性状的蛋白质，这在脑垂体和胎盘中形成糖蛋白激素的研究中，已得到证明。这一相关的激素家族包括促黄体素（lutropin）、促滤泡素（follitropin）和绒毛膜促性腺激素（chorionic gonadotropin）。这些激素上有些 N- 连接聚糖的主要作用可能是从由肝脏受体介导的循环系统中被定向清除。性腺中靶细胞上这些激素的受体与清除受体不同，它们都是 7 次穿膜螺旋家族的成员。靶细胞受体与完整的糖基化激素结合，可激活腺苷酸环化酶，但是去除 N- 连接聚糖则完全破坏了激活受体的能力。当整体聚糖消失，或者在去糖基化后，糖基化关键位点被定点诱变去除时，就会出现这种失活现象。如果只清除末端糖，这项处理即使影响清除受体的相互作用，也不会影响激素的活性。

结果说明 N- 连接寡糖的核心对激素与靶细胞受体结合有直接作用。但是，即使结合的激素不能使受体激活，去糖基化激素实际上增强了靶细胞受体的亲和力。对此现象最可能的解释是聚糖的缺失可能以异常方式曝露给与受体相互作用的新表面（图 8.7）。这种相互结合作用使亲和力增强，但是，也转移了激素激活受体所处的位置。这些结果表明，在解释去糖基化实验结果时，需谨慎对待。

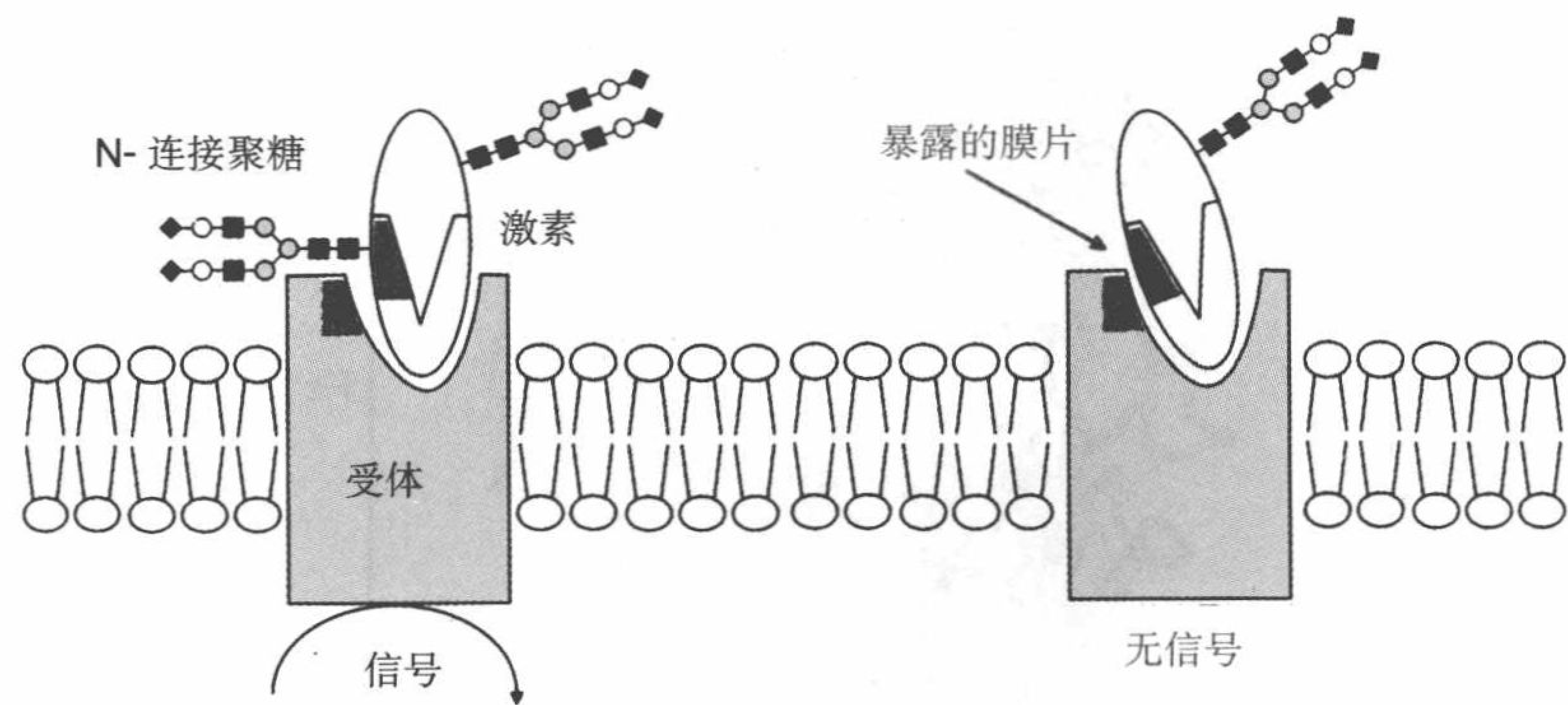


图 8.7　垂体和胎盘糖蛋白激素与激活腺苷酸环化酶受体的相互作用。特异糖基化位点的清除导致受体亲和力提高，可能因为激素表面上暴露的膜片与受体进行新的相互作用。这种相互作用不能激活受体。图中所示虽然都是二天线结构，但是不同的糖蛋白激素载有不同的聚糖（参见第 10 章）

聚糖在血清糖蛋白功能中具有多种作用的事实，使聚糖难以解释去糖基化实验。有人曾对结合激素红细胞生成素（erythropoietin）的 N- 连接聚糖的重要性进行了深入地研究，因为这一激素广泛地用于治疗贫血。对于结合红细胞生成素 N- 连聚糖的重要性有互相矛盾的诉求，就是因为它具有多项功能。糖基化影响激素的稳定性，也影响激活其受体的能力。

体外细胞实验表明，低糖基化也可以增强红细胞生长素受体的亲和力。但对其他一些血清蛋白的糖基化，其重要性是如将新生红细胞生成素从肾细胞中输送出去，而且对循环系统中激素的生存期产生影响。由于糖基化作用的缺失，可能导致低糖基化的红细胞生成素迅速从循环系统清除和降低稳定性，尽管在细胞实验中低糖基化的活性有所增加，但在生物体中则相对失活。

➊关于红细胞生成素参见框 **10.2**。

8.7 覆盖蛋白质表面的寡糖可保护蛋白质不被水解

如果蛋白质和聚糖的连键是灵活的而不是固定的，即使聚糖与蛋白质表面给定部分只是短暂接触，聚糖至少可以遮盖大部分蛋白质表面。虽然糖基化这种短暂的阻断不能完全防止蛋白水解反应，但可以增强蛋白质对水解的阻力。组织纤溶酶原的激活反应阐明了对蛋白质裂解的调控作用。当组织完整性已经复原时，蛋白酶纤溶酶通过降解血纤蛋白介导血块的清除而且血块起到了防止失血的作用（图 8.8）。活性纤溶酶产自裂解前体纤溶酶原的组织纤溶酶原激活物（tissue plasminogen activator, tPA），这种激活物以单链和双链两种形式存在。纤溶酶催化单链形式的激活物，裂解为活性更高的双链激活物，并形成正反馈环路。在 Asn184 残基糖基化的 1 型组织纤溶酶原激活物要比在此位置未糖基化的 2 型激活物对蛋白质水解更具抗性。结合 Asn184 聚糖的出现妨碍了纤溶酶接近 Arg275 的裂解位点，这是产生高活性双链组织纤溶酶原激活物所需要的部位。能以同速度激活的多种形式的组织纤溶酶原激活物用途更为广泛。但是，无论在 Asn184 有无结合聚糖，组织纤溶酶原的激活速度可以调控血凝块时，这种变异性只能是糖基化机器变化莫测引起的。

蛋白质表面的物理性覆盖有时可能提供抗阻蛋白酶的攻击。在去糖基化后，蛋白质确实容易被蛋白酶消化，虽然有时难以了解这一性质是否由不同程度糖基化作用引起的。特定糖结构将起这种作用似乎不太可能，因

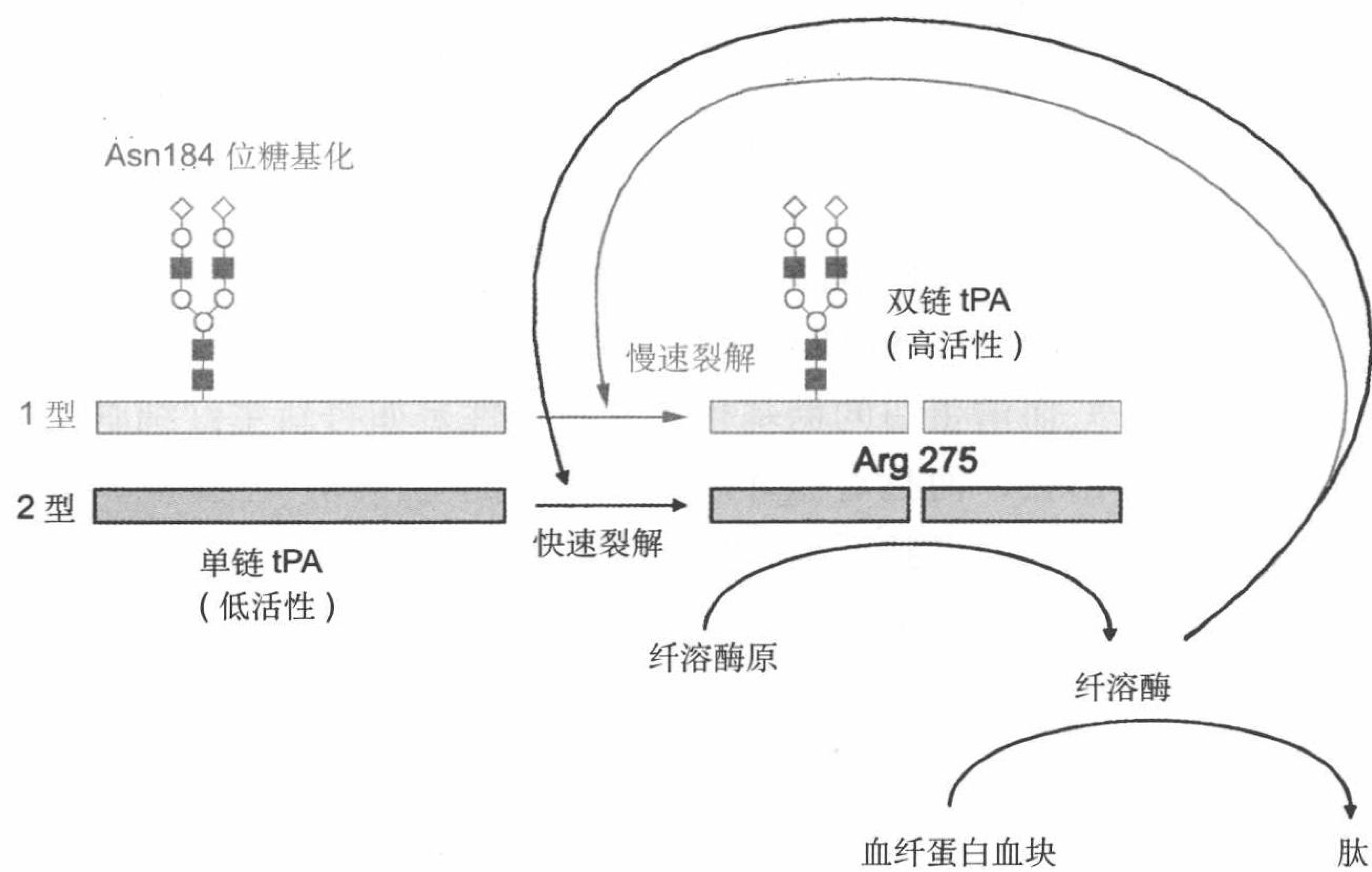


图 8.8　组织纤溶酶原激活物（tPA）对纤溶酶裂解的反馈环路。双链形式的组织纤溶酶原激活物的活性至少高于单链形式的5倍。两种形式的tPA在117位和448位都载有N-连接聚糖。它们与在184位的tPA有所区别，184位的1型tPA是糖基化的，2型tPA是未糖基化的。在184位因缺失糖基化可使2型tPA蛋白酶更快的激活

为多数聚糖都有同样的这种作用。至于蛋白质结构在中性演化的情况下，聚糖结构向不同方向发展的趋异性，是可以容许的。

小　结

有许多方法可用于生产糖基化程度降低或改变的糖蛋白。多数情况下，糖基化的改变对蛋白质的功能是中性的，但是，结合聚糖确实影响蛋白质的结构和活性。糖的结合虽然不能改变折叠蛋白质的稳定构象，但通过添加氢键和疏水相互作用可使构象保持稳定。因为糖不能单独地起稳定作用，糖基化的这一功能不可能成为糖基化机器的进化动力。但是如果糖基化机器适得其所，自然选择就会利用糖基化提供的这种稳定作用。糖类也可以用于防护蛋白质表面各部分不受水溶剂和蛋白酶的侵袭。多数情况下是整体聚糖和聚糖的核心结构在起作用，因此，末端结构的变异性是可以接受的。

主要参考文献

Blum, M. L., Down, J. A., Gurnett, A. M., Carrington, M., Turner, M. J., and Wiley, D. C. (1993). A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei, Nature* **362**, 603-609. 两种椎虫变体表面糖蛋白的晶体学分析。

Feige, M. J., Nath, S., Catherino, S. R., Weinfurtner, D. , Steinbacher, S. , and Buchner, J. (2009). Structure of the murine ungtycosylated IgGl Fc fragment, *Journal of Molecular Biology* **391**. 599-608. 本文描述构成糖基化和非糖基化 IgG 不同活动方式的结构变化。

Mer, G., Hietter, H., and Lefevre, J. -F. (1996). Stabilization of proteins by glycosytation examined by NMR analysis of a fucosylated proteinase inhibitor, *Nature Structural Biology* **3**, 45-53. 描述显示由 O- 连接岩藻糖稳定蛋白酶抑制剂 PMP-C 的实验。

Purohit.S., Shao, K., Balasubramanian, S. V, and Bahl, O. P. (1997). Mutants of human choriogona-dotropin lacking N-glycosy[chains in the A-subunit: mechanism for the differential action of the N-linked carbohydrates, *Biochemistry* **36**, 12355-12363. 描述 N- 连接聚糖对绒毛膜促性腺素结构和活性影响的分析。

Shental-Bechor, D. and Levy, Y.(2009). Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosyiation code, *Current Opinion in Structural Biology* **19**, 524-533. 聚糖对天然的和未折叠的蛋白质稳定性影响的计算分析。

Wittwer. A. and Howard, S. C. (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain tissue-type ptasminogen activator by plasmin, *Biochemistry* **29,** 4175-4180. 显示了糖基化反应通过抑制蛋白质裂解调制 tPA 活性的重要实验。

Wormatd, M. R. and Dwek, R. A. (1999). Glycoproteins：gtycan presentation and protein-fold stability, *Structure* **7**, R155-R160. 评论通过 N- 连接聚糖的存在稳定蛋白质的一些实例。

Wyss, D.F., Choi, J.S., Li, J., Knoppers, M.H., Willis, K.J., Arulanandam, A.R.N., Smolyar, A., Reinherz, E.L., and Wagner, G. (1995). Conformation and function of the N-linked glycan in the cell adhesion domain of human CD2, *Science* **269**, 1273-1278. 描述显示由高甘露糖型 N- 连接寡糖稳定 CD2 的实验。

习　题

8.1 通过删除糖基化位点的突变，预计糖蛋白的性质会有怎样的变化？

8.2 如果你正在研究含有唾液酸化三天线复合型 N- 连接寡糖在大肠杆菌中表达的酶，并分析其活性。发现这种重组形式的酶只有天然酶 25% 的活性，你将

采用什么方法研究对酶活性具有重要意义的 N- 连接寡糖?

8.3 讨论关于 N- 连接寡糖防护溶酶体膜蛋白质不受蛋白水解酶影响的实验。

参考文献: Kundra, R. and Kornfeld, S. (1999). Asparagine-inked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31039-31046.

8.4 IgG Fc 区的糖基化，对 IgG 的功能有何影响?

参考文献: Readaev, S. and Sun, P.D. (2001). Recognition of IgG Fcγ receptor:The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16478-16483.

Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.-H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P.D. (2001). The structure of a human type Ⅲ Fcγ receptor in complex with Fc, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16469-16477.

细胞黏附和信号传送中的糖识别

9

学习目的

学习本章后应知内容：

1. 根据糖识别域结构的糖结合蛋白分类
2. 甘露糖结合蛋白和先天免疫系统中其他 C- 型凝集素的作用
3. 如何发挥选凝素细胞黏附分子功能
4. 免疫系统中涎免凝素（siglecs）的黏附和信号传送功能
5. 半乳凝素调控淋巴细胞和其他细胞的黏附和信号传送

在前面几章中曾提到作为聚糖特异性受体的凝集素。这一章和第 10 章主要介绍凝集素行使的生物过程。讨论的内容有些是关于识别外源细胞表面和介导或调控免疫应答病原体的凝集素，另一些是关于结合内源糖和介导细胞表面黏附和信号传送事件的凝集素。讨论这些特定事例之前，有必要先对凝集素分子的特征做一些介绍。

9.1 动物凝集素根据其结构进行分类

通常凝集素结合糖的活动都是在蛋白质分散的蛋白质模块中被称为糖识别域（carbohydrate-recognition domain, CRD）内进行。凝集素根据糖识别域的结构分类（表 9.1）。凝集素糖识别域负责识别功能，凝集素多肽中的其他结构域负责介导识别事件之后的应答。一般情况下，不同类型的 CRD 有不同的世系和不同的多肽折叠模式。CRD 的整体折叠由各 CRD 家族保守残基的特性确定。这些残基形成疏水核心，在有些情况下，形成二硫键和二价阳离子的结合位点。

虽然是根据蛋白质序列制定 CRD 的分类方案，但特定类型的 CRD 往往都倾向于具有结合聚糖的性质。例如，C 型 CRD 是以 Ca^{2+} 依赖方式结合聚糖。但是不能单靠这一性质作为区别 C 型 CRD 的特征，因为，钙连

表 9.1　糖识别域（CRD）类型

类型	结构	典型配体	功能举例
钙连蛋白	β 夹层	Glc_1 Man_8	内质网内蛋白质分拣
M- 型	α 螺旋折叠桶	Man_8	内质网相关蛋白质降解
L- 型	β 夹层	$Man_{5\text{-}9}$	内质网内蛋白质分拣
P- 型	独特的富含 β 结构	甘露糖 6- 磷酸	后高尔基体蛋白质分拣
C- 型	独特的 α/β 混合结构	多种	细胞黏附（选凝素）
			糖蛋白清除
			天然免疫（胶原凝素）
半乳凝素	β 夹层	b- 半乳糖苷	细胞表面聚糖交联
I- 型	免疫球蛋白超家族	唾液酸	细胞黏附（涎免凝素）
R- 型	β- 三叶肽	多种	酶导向和糖蛋白激素周转

蛋白（calnexin）、钙网蛋白（calreticulin）和 L- 型凝集素（L-type lectin）都是以 Ca^{2+} 依赖方式作为配体与糖结合。值得注意的是，有些情况下，与某种特殊类型 CRD 结合的聚糖与结构密切相关，然而不同情况下，CRD 结合的聚糖表现各不相同。尽管事实上都认为不同 CRD 家族其蛋白质折叠模式有所不同，但这些糖结合方式不同的蛋白质，却有共同的选择性主题，有关这方面的议题将在本章和下一章中重点讨论。

9.2　甘露糖结合蛋白是宿主的一种防御分子，并启动凝集素补体激活途径

也称作甘露糖结合凝集素（mannose-binding lectin，MBL）的血清甘露糖结合蛋白（mannose-binding protein, MBP）结合微生物表面的糖结构，利用结合能力区别这种外源性结构和哺乳动物聚糖的不同，提供一种鉴定和中和病原体的作用机制。因此，构成血流中循环的 MBP，被赋予了天然的免疫应答。天然免疫（innate immunity）与获得性免疫（adaptive immunity）不同，获得性免疫需要生成特异性抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞来应答外源物的出现。

MPB 寡聚体的组装须经过两个阶段（图 9.1）。第一阶段，由三个多

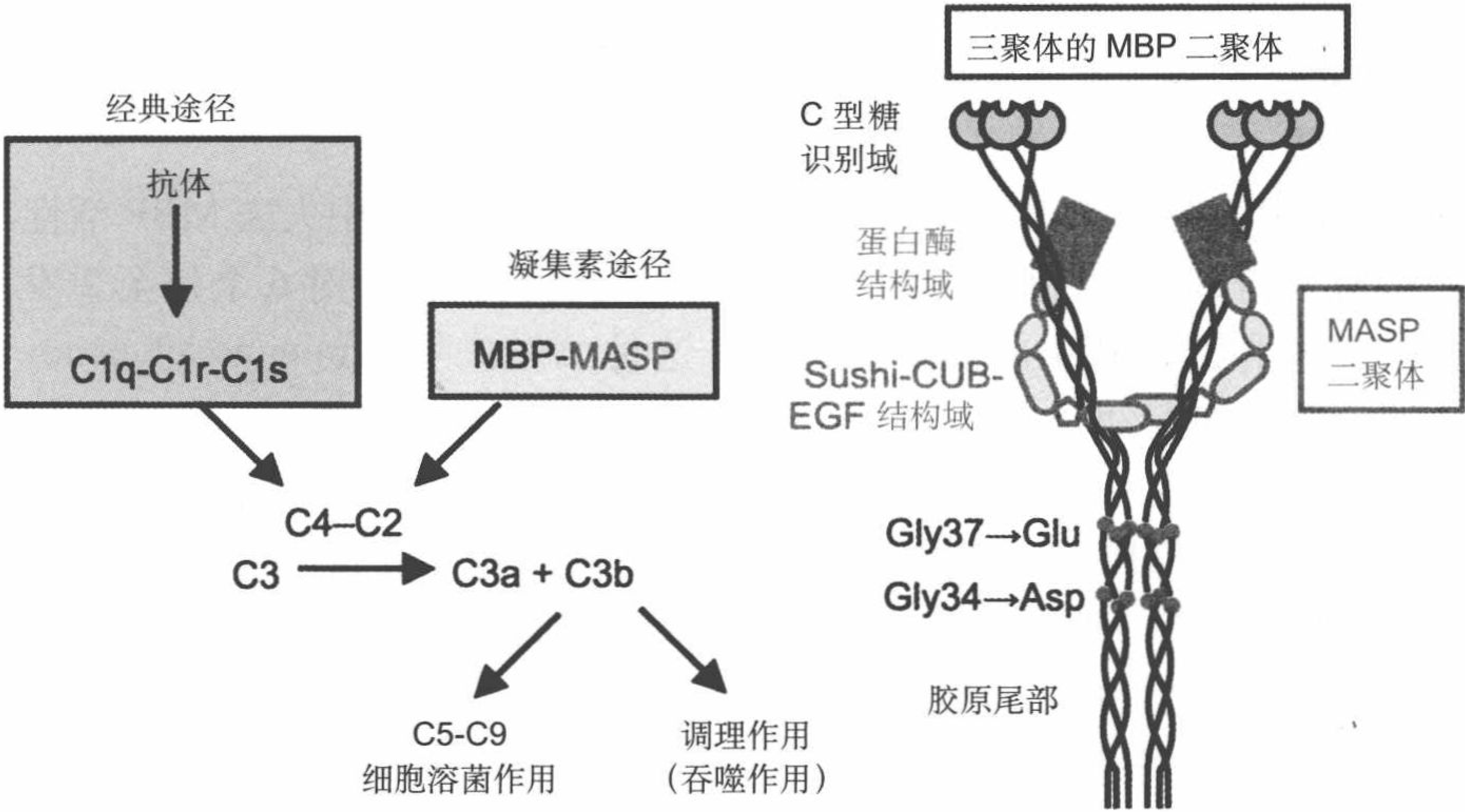


图 9.1 甘露糖结合蛋白（MBP）在天然免疫中的功能具有 MBP- 相关丝氨酸蛋白酶（MASP）-2 的 MBP 复合物，通过补体成分 C1qC1rC1s 经典激活途径同样机理，激活 C3 转化酶（C4-C2）。激活过程中，须经 MBP CRD 与细胞表面聚糖一系列多价相互作用。EGF. 表皮生长因子

肽缔合形成三聚体，由两个螺旋区，复绕的 α 螺旋组成的颈部和形成胶原样螺旋的尾部稳固这一三聚体。这些三聚体基本构件横向缔合，组装成由 6 个或更多多肽组成的大分子寡聚体。这种由胶原和凝集素结构域组成的整体组织分子统称为胶原凝素（collectin）。

当 MBP 的 C 端识别部分结合微生物表面的糖时，N 端胶原样结构域，能够直接与巨噬细胞上的胶原凝素受体（collectin receptor）作用，导致吞噬。更为常见的情况是 N 端胶原样结构域起始补体途径（complement pathway）的凝集素分支（lectin branch）。在补体结合（complement fixation）的经典途径（classical pathway）中，结合病原体的抗体导致结合补体的第一成分 C1q。C1q 的分子结构呈花束样，由胶原样“花”茎维系在一起，与 MBP 结构非常相像。C1q 分子与 C1r 和 C1s 两丝氨酸蛋白酶缔合，通过激活 C4 和 C2 补体成分启动蛋白酶解的级联反应。通过 MBP 相关丝氨酸蛋白酶（MBP-associated serine proteases, MASP），MBP 同样也能启动级联反应。从任何途径中产生的 C2-C4 激活复合物裂解补体固有成分 C3，导致大分子 C3b 的片段在靶表面沉积。C3b 通过与巨噬细胞上的受体相互作用介导病原体的吞噬。固定化的 C3b 除具有这种调理素作用外，也能启动裂解途径，其中另一些新增补体成分在此途径中组装成膜孔。

还不清楚 MBP 与富糖表面的结合过程中，如何激活 MASP，但对富糖表面的 CRD 聚簇之间产生横向相互作用，并改变 MASP 结合区胶原样茎部间的角度，已有所了解。

MBP 介导的天然免疫应答的重要性，已经从血清中失去 MBP 活性与病情有关得到证实。胶原样 MBP 结构域的突变，特别对 6 个月至 2 岁儿童的复发和严重感染的易感性有关。这种免疫缺陷（immunodeficiency）表明，因为在婴幼儿自身免疫系统全面发育期间，由胎盘或母乳摄入提供的抗体逐渐消失所致。在获得性免疫缺陷综合征，艾滋病（AIDS）患者中 MBP 的作用也很明显。通过建立获得性免疫应答和依靠 MBP 提供的天然防御，患者具有一种综合平衡的能力。如果患者还患有遗传性 MBP 缺陷症，对机会感染尤为敏感，而且预期寿命短。

糖生物学和疾病**免疫缺陷**

已对 MBP 缺陷病的分子原理有所了解。导致 MBP 缺陷症出现的两种最常见的突变是胶原样结构域内的甘氨酸残基产生变化。谷氨酸或天冬氨酸侧链的插入将破坏这一结构域的正常结构，为了进入三螺旋构象，每次插入的第三个残基必须是甘氨酸（图 9.1）。这种破坏作用也破坏了包括 MASP 结合位点在内的胶原样结构周围区域的稳定。MASP 的缺陷性结合也成为缺陷表型的主要原因。虽然纯合性个体对这两种突变症的易感性非常明显，但杂合性个体中也有发现。这一重要的行为是由混合的野生型和 MBP 多肽突变形式引起的，因此，主要原因是没有形成具有正确折叠胶原结构域的寡聚体。

另外两个胶原凝素肺部表面活性型蛋白质 A 和 D（surfactant proteins A and D, SP-A 和 SP-D）在天然免疫应答中也很重要。在肺泡空间形成磷脂和蛋白质部分混合物内衬的这两种蛋白质，可以防御微生物侵入肺部。与 MBP 一样，这两种蛋白质通过 C- 型糖识别域，与病原体表面上的糖结合。但是，肺部胶原凝素的胶原结构域，不能启动补体的结合作用。作为替代，由 SP-A 和 SP-D 胶原结构域与肺泡巨噬细胞上的受体相互作用，导致结合微生物的吞噬。

9.3　单糖结合专一性和寡聚体几何形状导致甘露糖结合蛋白识别病原体

复合型配体与 C- 型动物凝集素的结合，是以寡糖选择性地识别初始单糖组合或延伸结合位点为基础。根据哺乳动物糖蛋白和糖脂的不同成分

和结构与大部分微生物表面的糖蛋白和糖脂进行比较来区别 MBP 自身和非自身的能力。细菌、酵母和真菌上的聚糖虽有广泛的不同，但它们之中的多数都有几个共有的特征。由于这些聚糖都在结构方面起作用，往往都有重复性结构，而且其末端结构常常出现葡萄糖、GlcNAc 和甘露糖残基（图 9.2）。MBP 利用这些特征进行识别。尽管名称为甘露糖结合蛋白，但 MBP 对末端位置的葡萄糖、甘露糖和 GlcNAc 残基，都具有同等的亲和力。

大肠杆菌脂多糖

Glcα1-6Glcα1 (3) / GlcNAcα1 (2) → Rhaα1-3FucNAc-核心脂质

白色念珠酵母菌甘露聚糖

Manα1 (6) / Manα1 (3) → Manα1-2Manα1-2 → (6) Manα1 (6) → ...
Manα1 (6) / Manα1-2Manα1 (3) → Manα1-2Manα1 (2) → Manα1 (6) → ...
Manβ1-2Manα1-2Manα1-2Manα1 (2) → Manα1 (6) → Manα1-Core-GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn

利什曼杜罗万氏菌脂磷酸聚糖

Manα1-2-Manα1-P-[6Galβ1-4Manα1-P]$_n$-6Galα1-6Galα1-3Gal*f*β1-3Manα1-3Manα1-4GlcN-脂质
(6) | Glcα1-P

分枝杆菌属结核病脂质阿拉伯甘露聚糖

Manα1-2Manα1-5Araβ1-2Araβ1-(Ara)$_n$-Manα1 (6)
Manα1 (2) → Manα1 (6)
Manα1 (2) → Manα1 (6)
Manα1 (2) → Manα1 (6)
Manα1 (2) → Manα1 (6)
→ Manα1-核心脂质

图 9.2 在潜在的致病性微生物上出现的表面聚糖举例。蓝色表示作为甘露糖结合蛋白配体和甘露糖受体的末端残基

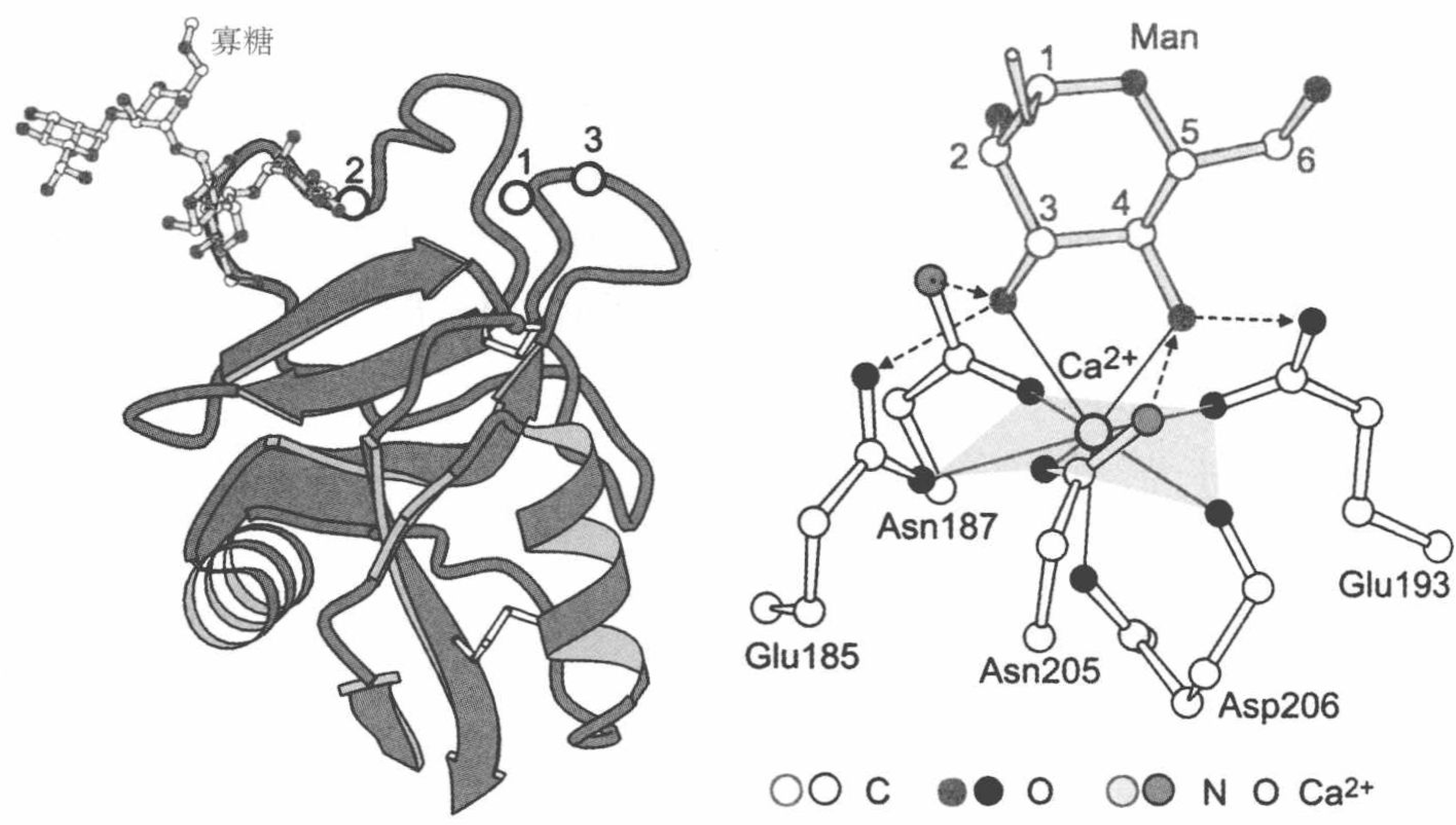


图 9.3 具有结合寡糖的甘露糖结合蛋白的糖识别域结构。右图为 Ca^{2+} 周围结合位点的特写图。用虚线箭头表示氢键从供体指向受体的方向。实线表示配位键，蓝色表示垂直键，黑色为平伏键（根据蛋白质数据库 2MSB 条目）

血清 MBP 的 C- 型糖识别域中，糖结合位点位于靠近其中的一个 Ca^{2+}（图 9.3）。结合甘露糖的 3 位和 4 位的羟基基团与 Ca^{2+} 配位配体的 4 个氨基酸侧链形成氢键。每一糖羟基的氢键皆有极性和协同作用：带负电荷的羧基从糖羟基接受氢键，糖羟基再从天冬酰胺残基接受氢键。羟基上剩余的未共享电子对作为 Ca^{2+} 的配位配体。由此，结合位点中关键的相互作用对 3 位、4 位的羟基基团的定向很敏感，使甘露糖和其他 GlcNAc 糖的选择性结合具有与 3 位、4 位羟基同样的敏感倾向。MBP 与甘露糖和 GlcNAc 具有同样良好亲和力的相互作用，说明事实上在这两个不同糖之间的 2- 取代基上未发生相互作用。富含甘露糖型配体的表面和富含半乳糖配体表面之间虽稍有区别，但都可以行使天然免疫应答。

MBP 只与寡糖链中的末端糖残基相互作用（图 9.3）。与哺乳动物蛋白质高甘露糖型寡糖相互作用的解离常数约为 1mmol/L，与单糖相互作用的解离常数相同。MBP 的高亲和力结合需要多个糖识别域和多个末端甘露糖残基相互作用。MBP 的三聚体结构，为了与间隔适当的末端甘露糖残基相互作用，展现出簇聚的结构域（图 9.4）。三聚体中糖结合位点的间距约为 50Å，单个寡糖的多个末端甘露糖残基不能和这许多成簇的结合位点

相互作用。但是出现在微生物表面末端糖残基的阵列可以同时与多个位点相互作用。理想的情况是其中每一相互作用是独立的，多项相互作用的自由能是可以相加的。按△ $G=RTlnK_D$ 式，每增加一项相互作用，亲和力可以按比例增加。一项包括三个结合位点，解离常数为 1mmol/L 的三种相互作用，对于具有适当末端糖残基的多价配体，其总解离常数可达到 1nmol/L。

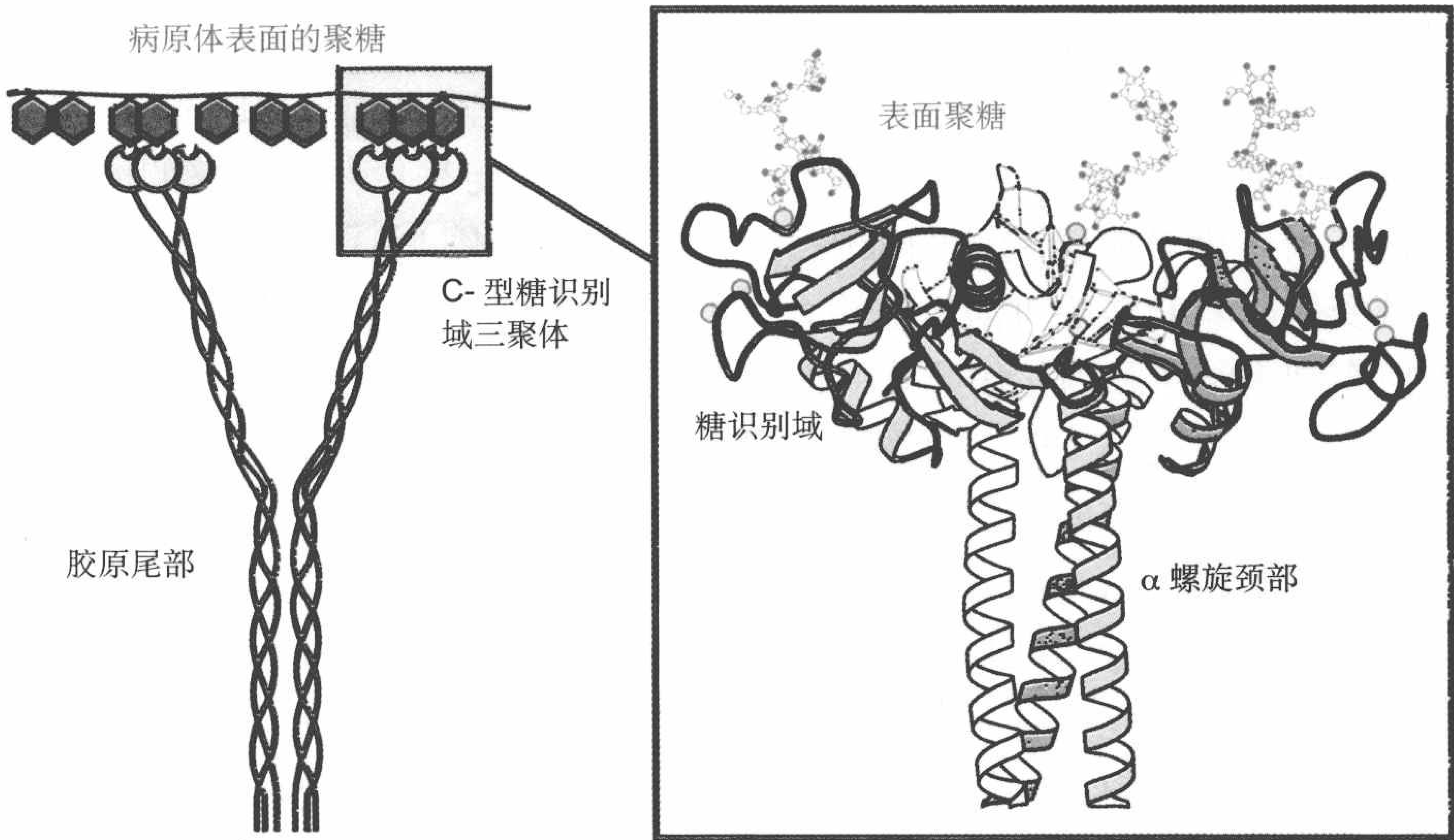


图 9.4 MBP 的整体结构和 CRD 三聚簇聚体特写图。图中显示寡糖的结合位置，表明配体如何从细胞表面突出并与多个结合位点相互作用（摘自 Weis,W.I. and Drickamer, K.（1996）Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry* **65**,441-473. 根据蛋白质数据库 2MSB 和 1RTM 条目）

为了达到与多价配体高亲和力结合，必须满足独立结合位点的条件。这一情况意味着蛋白质或者糖配体不能出现任何畸变。MBP 三聚体的建构为达到这些条件施加了很多限制。这一结构的一个关键特征是结合位点的间距固定。由复绕的 α 螺旋颈部盘环保持三聚体的稳定，而且复绕的盘环顶部可以广泛地与糖识别域相互作用，并保持其固定的几何图形。例如，这与抗体分子中出现柔性铰链区的例子有很大差别。保持结合位点间 50Å 的间距，使内源性高甘露糖结构不能与 MBP 高亲和力地结合。MBP 三聚体除有糖结合位点之间的固定间距外，其几何图形也确定了结合位点的方向，所有结合位点都从颈部区域突出，全部面向同一方向。这种排列方式显然非常适应 MBP 与微生物表面的相互作用。

9.4 甘露糖受体有助于巨噬细胞内化病原体

出现在肝脏中内皮细胞和肝巨噬细胞和其他组织巨噬细胞上的甘露糖受体和血清 MBP 一样，常与微生物表面的甘露糖和 GlcNAc 结合。胞外甘露糖受体结构域中，有 8 个 C- 型凝集素样结构域，其中有几个参与了载有末端甘露糖残基的 Ca^{2+} 依赖性配体的结合。结合 C- 型糖识别域的糖，对酸碱度敏感，因此，在核内体酸性环境下，配体从受体中释放，并导向溶酶体进行降解。在单个多肽链中，具有多个不同 C- 型 CRD 的 C- 型凝集素甘露糖受体与众不同。已经证实甘露糖受体与病原体细胞壁的成分结合，并用转染甘露糖受体的细胞证实吞噬作用（图 9.5）。由此表明，甘露糖受体除具有清除可溶性糖缀合物的作用外，在天然免疫应答方面，协助巨噬细胞结合和内化病原体的作用也不容忽视。

有关甘露糖受体参见 10.8 节。

糖生物学与疾病细菌感染

包括补体受体 CR3 和脂多糖受体 CD14 在内的几种巨噬细胞蛋白质与吞噬微生物作用中的甘露糖受体非常相似。但是，甘露糖受体是防卫卡氏肺囊虫（*Pneumoeystis carinii*）入侵的第一线主要巨噬细胞蛋白质。飘浮在空气中的病原体是常见肺炎的发病原因。肺囊虫的一种主要表面糖蛋白载有多种作为甘露糖受体配体的高甘露糖型 N- 连接聚糖。人类经常处于接触肺囊虫的环境中，但只在免疫系统受到损害时才发病。例如，由肺囊虫传染的肺炎，可能威胁艾滋病患者的生命。艾滋病患者感染人免疫缺陷病毒（HIV），导致甘露糖受体表达下调，从而干扰对肺囊虫的天然防御能力。另有一些与甘露糖受体结合的病原体，其中包括免疫系统感染受损患者的致病性白色念珠酵母菌（*Candida albicans*），和负责内脏利什曼原虫病的原生动物寄生虫利什曼杜罗万氏菌（*Leishmania donovani*）。

大多数病原体通过巨噬细胞的吞噬作用，在吞噬体与溶酶体融合后杀死微生物。但是，感染肺结核和麻风病的分枝杆菌仍能存活，还可以在巨噬细胞内增殖。这些有机体借助甘露糖受体得以进入巨噬细胞，但是它们防止吞噬体与溶酶体的融合，因而没有被破坏。甘露糖受体高亲和力地与脂阿拉伯甘露糖聚糖中的甘露糖二糖结合，这种脂聚糖是分枝杆菌夹膜结构的主要成分。基因学研究表明麻风病的一个重要易感性基因座，在甘露糖受体基因图谱上位于人染色体 10。但是，关于易感性越来越增强的基础分子机理，尚未得到确证。

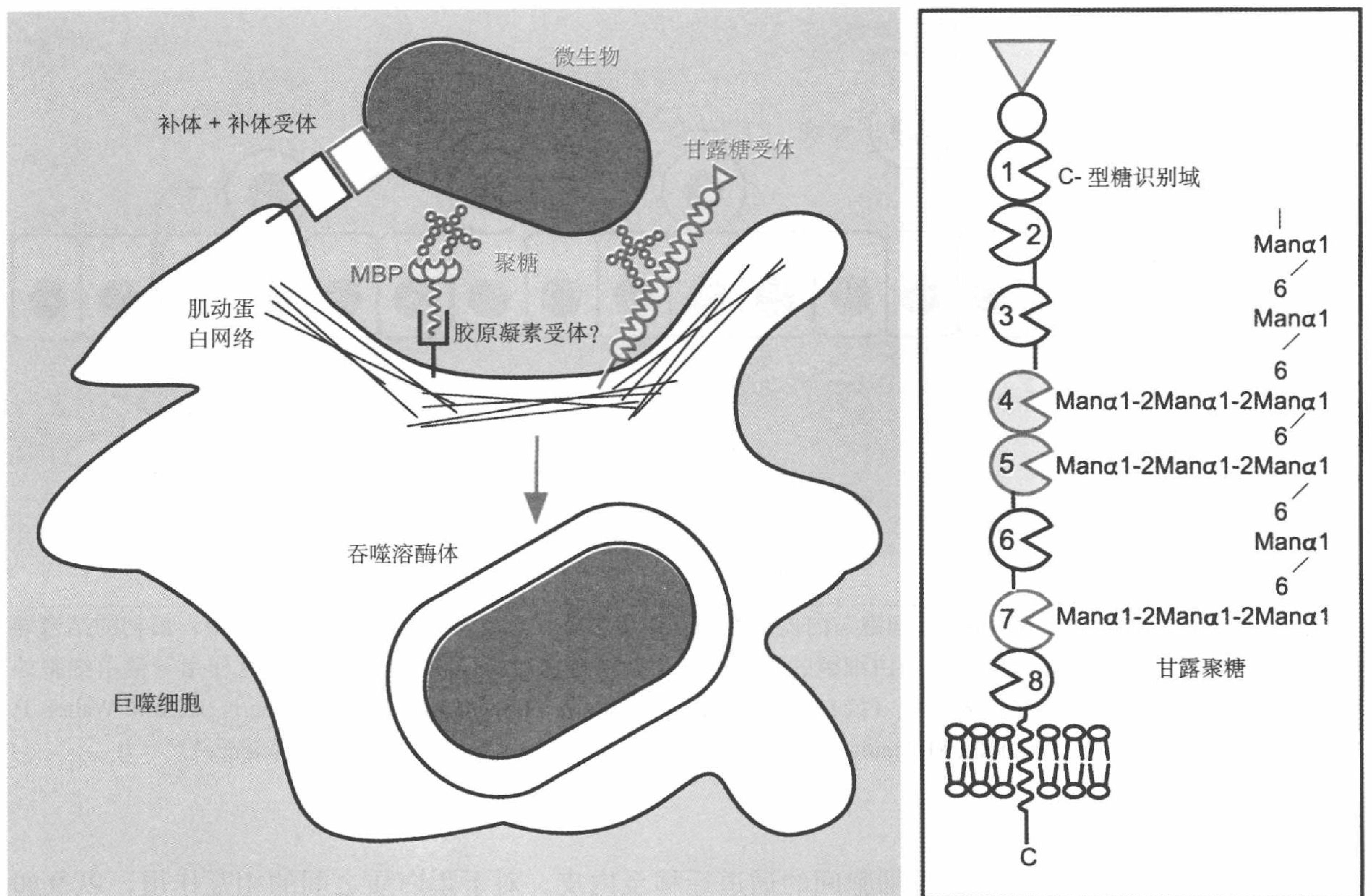


图 9.5 由受体（包括甘露糖受体）通过巨噬细胞介导的微生物吞噬作用。有些鉴定机构可能同时研究介导巨噬细胞和潜在病原体之间的相互作用。病原体表面上远隔的末端重复糖，有可能越过 4 和 5 核心糖识别域，与甘露糖受体的 C- 型凝集素样结构域进行次级相互作用

9.5 选凝素是白细胞的黏附分子

循环的白细胞必须与血管内衬的内皮细胞相互作用才能达到基础组织。归巢到外周淋巴结的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞和迁移至发炎部位的嗜中性粒细胞，都要进行这种相互作用。由选凝素细胞黏附分子开始进行白细胞和内皮相互作用的第一步骤。这些黏附分子都是一些熟知的 C- 型凝集素。3 种选凝素介导滚动相的启动，过程中白细胞与聚糖配体进行短暂接触和中断的相互作用（图 9.6）。这种短暂的结合事件，促使整联蛋白与其反受体之间形成蛋白质间稳定的相互作用。最后一步，白细胞通过内

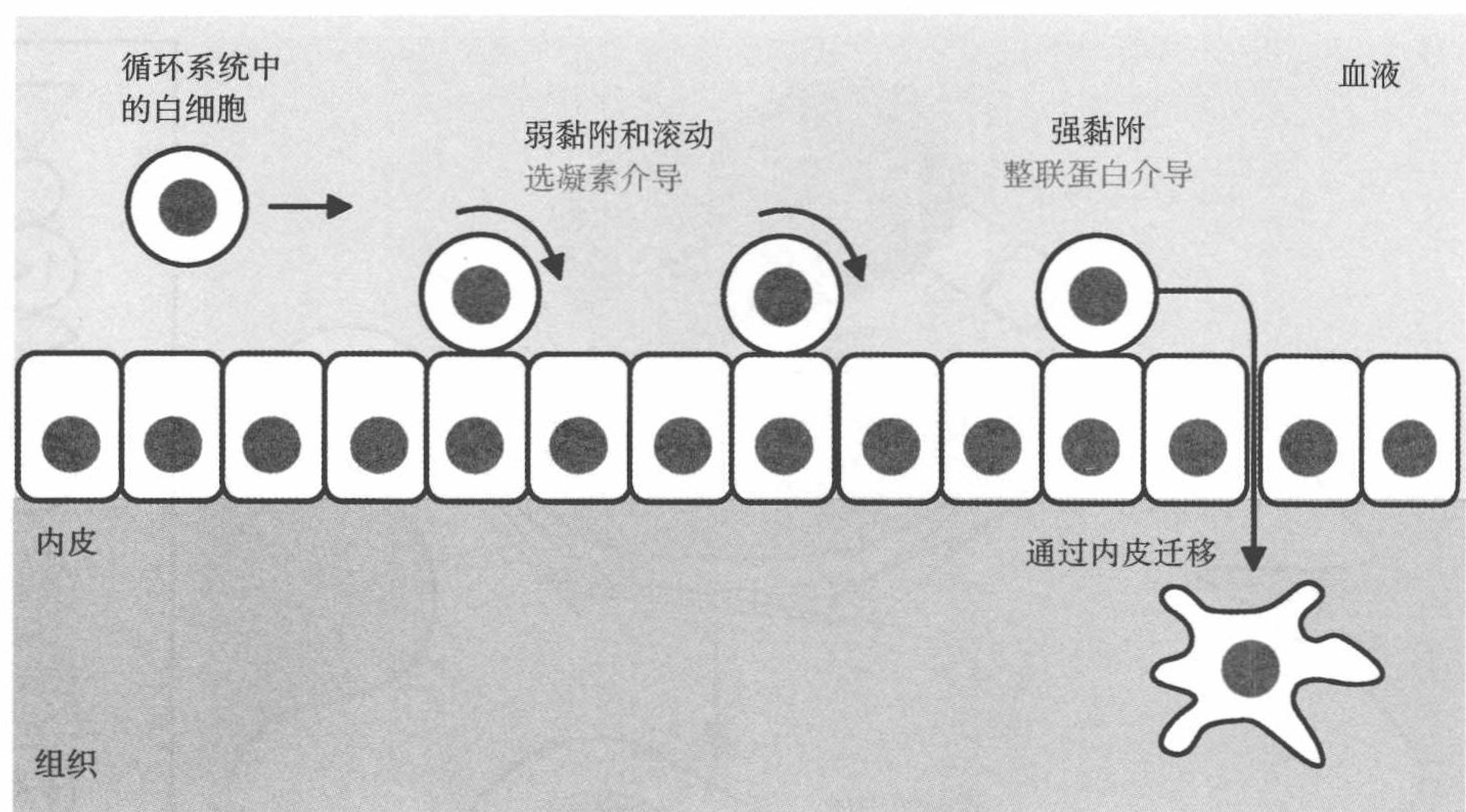


图 9.6　白细胞与内皮细胞相互作用步骤。选凝素介导初始的微弱结合，最初的结合导致内皮表面白细胞的滚动。继初始结合之后，整联蛋白介导的相互作用导致白细胞外渗进入组织（摘自 Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell (4th edn) . New York: Garland Science）

皮细胞与细胞间的通道迁移至内皮。对于蛋白质之间的相互作用，以及如何促使白细胞迁移尚未了解清楚。

淋巴细胞从释放、循环，然后返回进入外周淋巴结是一个连续过程。淋巴细胞表面的 L- 选凝素（L-selectin）与淋巴结中特定内皮细胞的含糖反受体结合。虽然 P- 选凝素（P-selectin ）和 L- 选凝素（L-selectin）两者都参与了嗜中性粒细胞迁移进入发炎部位的事件，但它们运作的时间范围不同。内皮细胞中的 P- 选凝素存储于被称为 Weibel-Palade 体的胞内小泡。当组织受损时，这些小泡立刻向内皮细胞表面递送 P- 选凝素，以便吸引循环中的嗜中性粒细胞。一经捕获，嗜中性粒细胞当即移入组织，并启动防护性应答。然后 E- 选凝素的转录作用增强，嗜中性粒细胞和巨噬细胞前体得以继续募集，L- 选凝素也可以使淋巴细胞和另一些嗜中性细胞与已经固定在内皮上的嗜中性细胞结合，因此，为白细胞归巢至炎症部位的作用机制提供了进一步的解释。

缺失一种或多种选凝素的敲除小鼠的表型，说明了这些蛋白质在白细胞运输中的作用。在缺失 P- 选凝素的情况下，内皮上滚动的白细胞明显减少，而且因为白细胞不能通过内皮迁移，循环系统中的白细胞数目增加。

缺失 P- 型和 L- 型这两种选凝素的小鼠表型大为增强。另外，这种双无效小鼠的自发感染率增加，说明在防御病原体的过程中，白细胞运输有多么重要。缺失 L- 选凝素的小鼠，表现淋巴细胞的归巢受到损害，但是，这些小鼠也显示其他白细胞在发炎上皮上的滚动减少。这种表型表明 L- 选凝素在白细胞募集中起作用，而不是嗜中性粒细胞在起作用。缺失 L- 选凝素可能消除构建免疫系统应答的能力，再一次证实了 L- 选凝素在白细胞募集和归巢功能方面的重要性。

●有关选凝素与癌症参见 **13.7** 节。

这 3 种选凝素具有共同的结构域组织，也具有局限在 N 端 C- 型糖识别域上结合配体的能力（图 9.7）。这一识别域紧邻表皮生长因子样结构域，和一系列共有的短型重复序列，以及从细胞表面突出 CRD 的寿司模

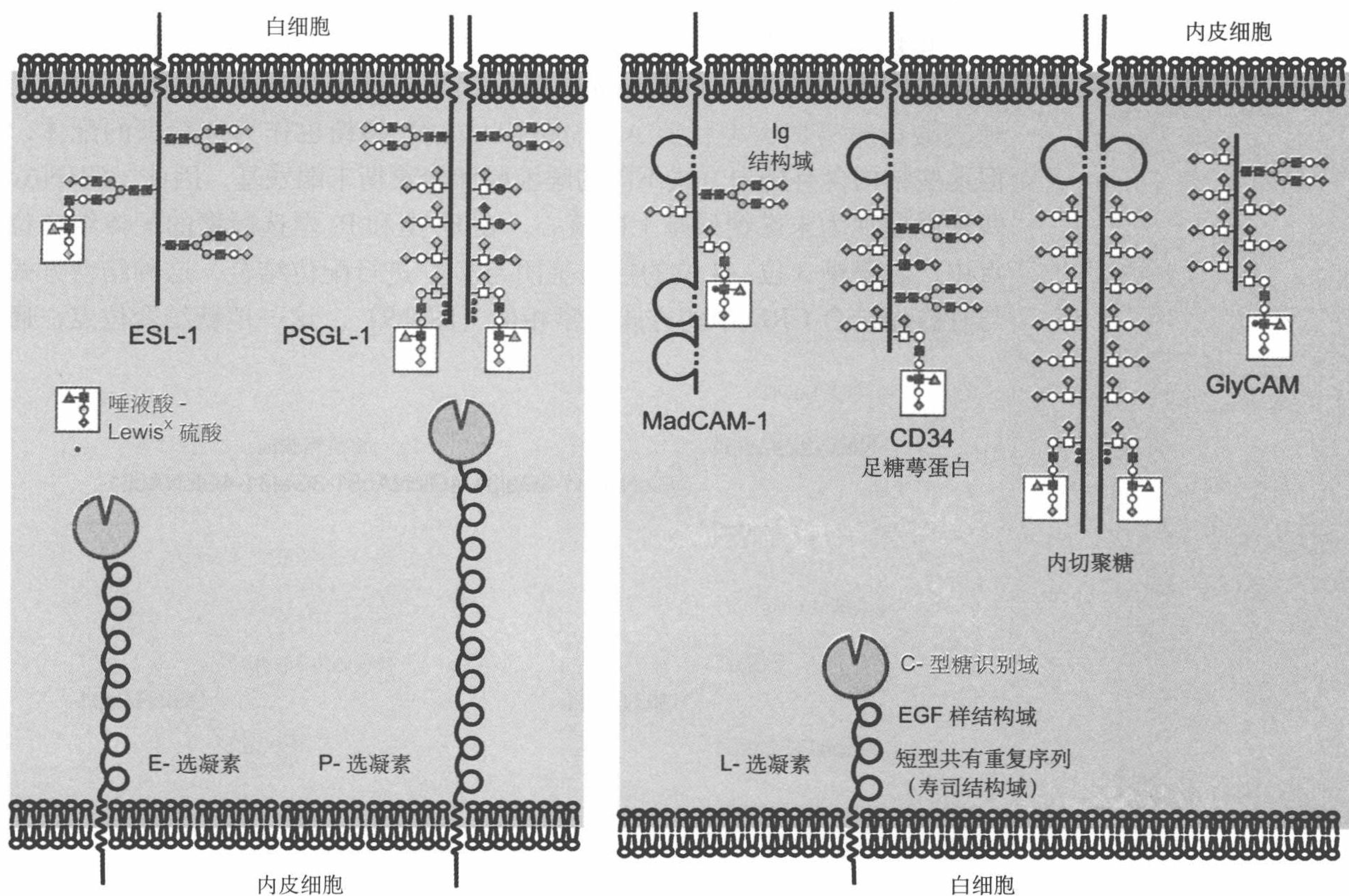


图 9.7　选凝素的结构域组织及其糖蛋白配体。符号示意载有 N- 连接和 O- 连接聚糖的蛋白质，但未标出确切的聚糖结构和具体的结合位点数目。EGF. 表皮生长因子；ESL.E- 选凝素配体；GlyCAM. 糖基化细胞黏附分子；Ig. 免疫球蛋白；MadCAM. 黏膜地址蛋白细胞黏附分子；PSGL.P- 选凝素糖蛋白配体

件（Sushi module）。滚动过程需要在白细胞和内皮之间形成一种接触和断开的精确平衡。通过各种因素可以取得这种平衡，这些因素中有些是选凝素固有的，如配体结合（$k_{开}$）和释放（$k_{关}$）的速度常数非常快捷。选凝素分子的延伸组织能够起到机械杠杆的作用。除固有的这些性能外，选凝素的密度和簇聚，以及从细胞表面突出微绒毛上的聚糖配体，以及选凝素与细胞骨架的相互作用都会对滚动力学造成影响。

9.6 通过 C- 型 CRD 延伸结合位点，选凝素对专一性糖配体的相互作用

包括唾液酸化路易斯血型抗原 X（sialyl-Lewis^x）四糖在内的 3 种选凝素的配体（图 9.8）的特征是末端都出现岩藻糖和唾液酸残基。相关的唾液酸化路易斯血型抗原 A（sialyl-Lewis^a）寡糖也作为选凝素的配体，但这些结构含有排列方式不同的唾液酸和岩藻糖末端残基。因此，GlcNAc 残基就展现为末端糖残基上的核心。在 E- 型和 P- 型选凝素的配体结合位点中，岩藻糖 3 位、4 位的羟基基团与 Ca^{2+} 进行配位结合，这种结合方式与甘露糖结合 CRD 中的方式非常相似（图 9.9）。这一单糖结合位点，通

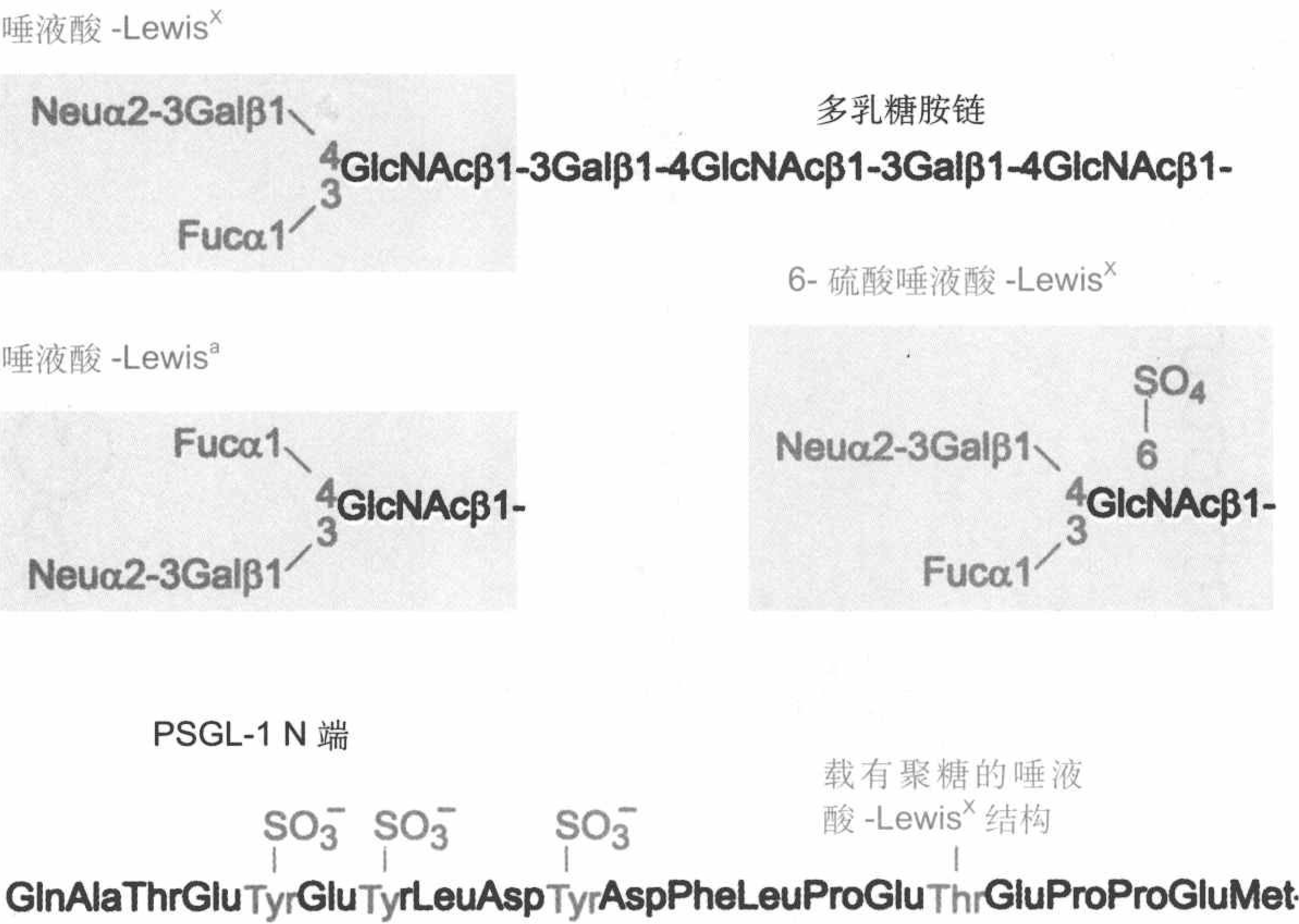


图 9.8 选凝素寡糖和糖肽配体的结构，蓝色为关键的末端结构

过一系列氢键与半乳糖和唾液酸残基的相互作用进行延伸。这样，完整的唾液酸 -Lewis^x 的结合位点为岩藻糖和半乳糖 - 唾液酸二糖有效地组成了两个亚位点。

对这一结构的 Lewis^x 部分进行了深入的研究，发现在单个构象中，不管是否与唾液酸复合，Lewis^x 部分始终保持恒定。主要是，或者至少部分是半乳糖和岩藻糖适宜的 van der Waals 包装保证了 Lewis^x 构象的稳定。正如预期的一样，一直到配体与 E- 型和 P- 型选凝素的结合，构象保持不变。从扭角能线图上可以看出，与唾液酸和半乳糖连键有关的几个 ψ 角，其能量相等。在溶液中，最低能量形式占有优势，但在选凝素复合物中发现了另外的构象异构体。从绝对最低能量形式的构象中移动配体，只耗用很少的能量。寡糖构象最低或接近最低能量的结合，是凝集素与复合配体结合的普遍特征，也反映出聚糖结构的畸变，将破坏蛋白质与糖间有限接触次数获得的微小能量。

➡有关 Lewis^X 构象参见 7.5 节。

虽然所有选凝素都能与唾液酸 -Lewis^x 及其有关的配体结合，但各种选凝素都优先与特异蛋白质载体背景下的聚糖结合（图 9.7）。P- 选凝素与白细胞 P- 选凝素糖蛋白配体 1（P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1）之间的相互作用可以充分说明这一特征。PSGL-1 是一种具有黏蛋白样结构域的穿膜蛋白。多数 O- 连接聚糖是保持多肽链延伸构象的唾液酸化短型结构。靠近 N 端，与特异苏氨酸残基结合的延伸聚糖载有

➡有关黏蛋白样结构域参见 3.1 节和 3.2 节。

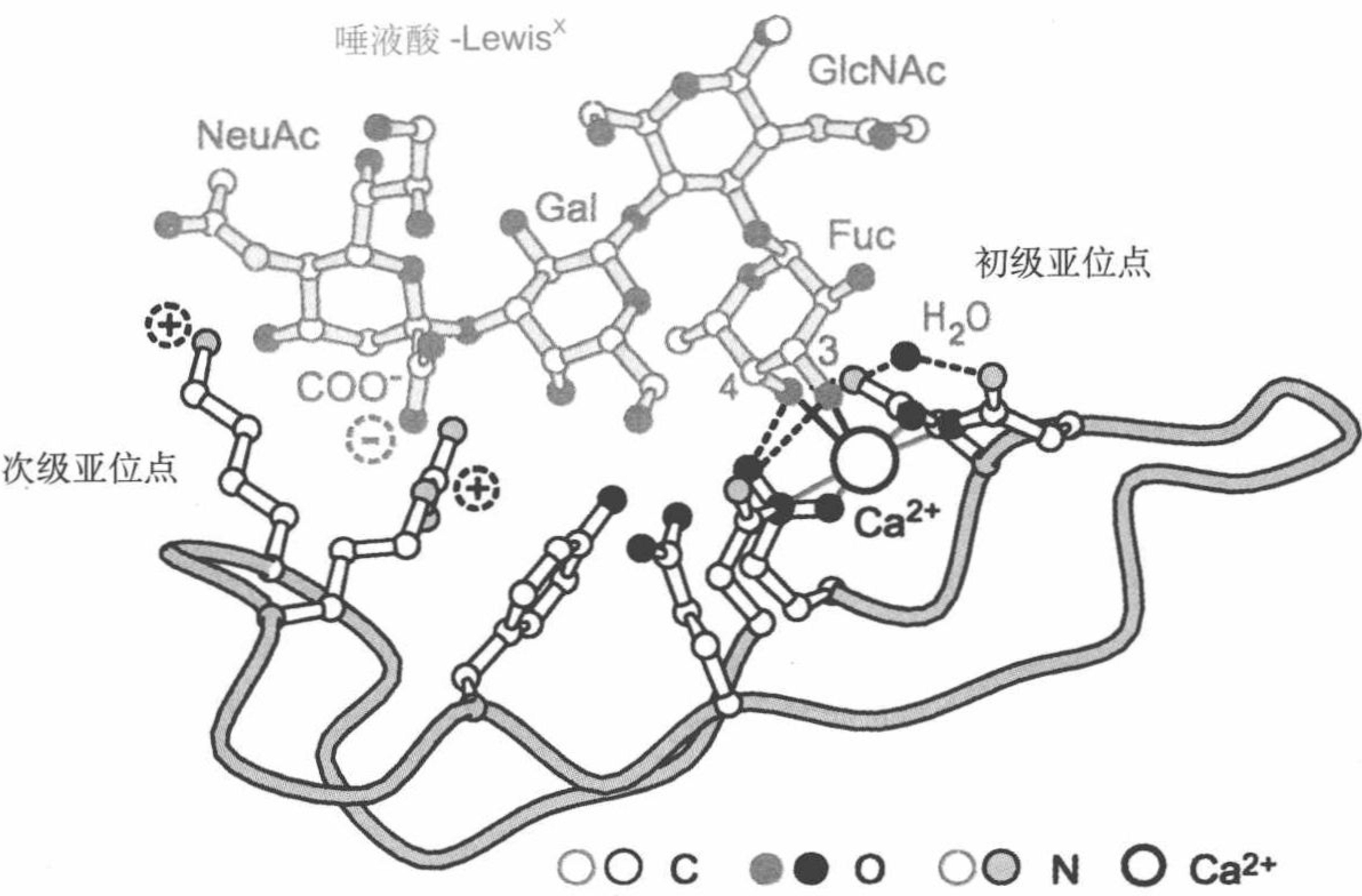


图 9.9 E- 选凝素 CRD 的延伸结合位点，眼前看到的为初级和次级结合亚位点。GlcNAc 成为岩藻糖和半乳糖间的桥键。岩藻糖基结合一级亚位点，而半乳糖和唾液酸与二级亚位点正电荷相互作用（根据蛋白质数据库 1G1T 条目）

结合 P- 选凝素的唾液酸 -Lewis^x 结构（图 9.8）。但是，高亲和力的结合，需要在关键糖基化位点 N 端一侧出现硫酸化酪氨酸残基。硫酸基团与 P- 选凝素表面相邻糖的结合位点的正电势区相互作用。PSGL-1 的抗体可能阻塞 P- 选凝素介导的滚动，表明 PSGL-1 是白细胞上最为重要的 P- 选凝素配体。

PSGL-1 也可以作为 E- 选凝素的配体，但不需要硫酸化酪氨酸参与这一相互作用。E- 选凝素还可以与另一白细胞表面蛋白质的 E- 选凝素配体 1（E-selectin ligand 1, ESL-1）结合。ESL-1 不同于其他选凝素糖蛋白配体，它不含 O- 连接聚糖，只含 N- 连接聚糖。N- 连接聚糖上出现 N- 乙酰 - 乳糖胺结构，有可能像在 O- 连接聚糖上一样，构建唾液酸 -Lewis^x 基团（图 9.8）。

L- 选凝素的糖蛋白配体也具有黏蛋白样特性，具有多个 O- 连接聚糖结合位点。当小鼠分泌的糖基化细胞黏附分子 1（glycosylated cell-adhesion molecule 1，GlyCAM1）与高内皮小静脉质膜缔合时起受体作用，当出现在血清中时，则竞争结合。在人和小鼠中，免疫球蛋白超家族成员 CD34、内聚糖（endoglycan）和足糖萼蛋白（podocalyxin）是 L- 选凝素的细胞表面受体。在多肽链胞外部分延伸的黏蛋白样结构域上，都结合着 N- 连接和 O- 连接聚糖。在黏膜淋巴结中新增加的候选黏膜地址蛋白细胞黏附分子 1（mucosal addressin cell adhesion molecule 1, MadCAM-1）也可以作为整联蛋白的受体。以高亲和力与 L- 选凝素结合的聚糖，在 GlcNAc 残基 6 位上含有再次进行硫酸化修饰的唾液酸 -Lewis^x 基团（图 9.8）。GlyCAM-1 上，约有 20% 的聚糖和与 L- 选凝素结合的 CD34 都含有这种 6- 磺基 - 唾液酸 -Lewis^x 表位。小鼠的 GlcNAc6ST-1 和 GlcNAc6ST-2 这两个 GlcNAc-6-O- 磺基转移酶都参与了 6- 磺基 - 唾液酸 -Lewis^x 的形成。缺失 GlcNAc6ST-1 和 GlcNAc6ST-2 这两种转移酶的敲除小鼠中，归巢外周淋巴结的淋巴细胞大为减少，表明 6- 磺基 - 唾液酸 -Lewis^x 作为 L- 选凝素配体的重要性。内聚糖（不是 L- 选凝素糖蛋白配体）有一 N 端区，区内含由硫酸化的酪氨酸残基和由唾液酸 -Lewis^x 修饰的聚糖，L- 选凝素和内聚糖的相互作用很可能与 P- 选凝素 /PSGL-1 的相互作用非常相似。因此，形成 L- 选凝素的配体，都需要蛋白质和聚糖专一性的磺基转移酶。

糖生物学与疾病**白细胞黏附缺陷症**

患有极为罕见的临床综合征——Ⅱ型白细胞黏附缺陷症（leucocyte adhesion deficiency type Ⅱ，LAD- Ⅱ）患者的证据，表明免疫系统细胞运输中，选凝素对含岩藻糖配体的识别非常重要。这些患者具有高水平的循环嗜中性粒细胞和表现对传染的易感性，由于患者介导岩藻糖基转移酶的

供体糖进入高尔基体腔内的 GDP- 岩藻糖转运蛋白出现缺陷，不能合成选凝素的聚糖配体和含有岩藻糖的聚糖。

➲有关 LAD- Ⅱ参见 5.1 节。

9.7 C- 型凝集素参加抗原提呈过程

C- 型凝集素向 T 淋巴细胞提呈抗原过程中起两种不同的作用，抗原提呈是抗体或细胞毒性 T 淋巴细胞介导发展适应性免疫应答的第一步（图 9.10）。清除潜在外来物质的几个受体都是 C- 型凝集素家族成员。定居

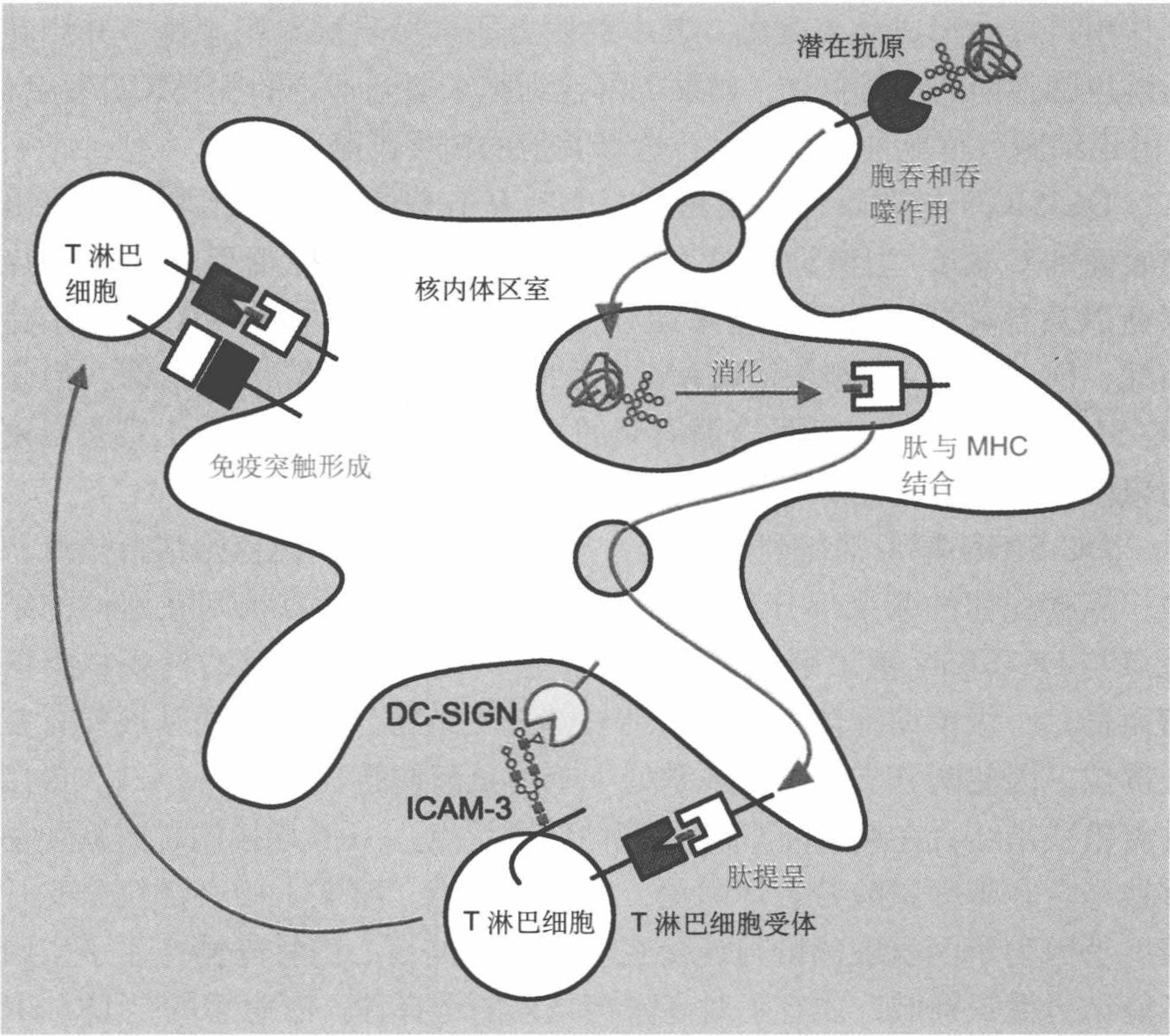


图 9.10 C- 型凝集素通过树突细胞在抗原提呈中的作用。包括作为甘露糖受体内源细胞凝集素在内的各种受体，介导潜在的抗原内化作用，这些受体被降解，并通过 MHC 分子提呈在树突细胞表面。通过 DC-SIGN 和 ICAM-3 之间的相互作用使 T 淋巴细胞更好地完成探查树突细胞表面。T 淋巴细胞受体与提呈的一种抗原相互作用，形成免疫突触和 T 淋巴细胞的刺激作用

在外周组织， 如皮肤和小肠内衬中的树突细胞，利用这些受体捕获蛋白质和糖蛋白抗原。内化后的抗原经过消化产生肽片段，当树突细胞迁移至淋巴结后，抗原片段返回细胞表面，与主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）分子复合。特异的肽 -MHC 复合体能和 T 淋巴细胞受体相互作用，但是，只有 T 淋巴细胞总数的一小部分种群适合作为特定肽的表达受体。因此，T 淋巴细胞必须选检树突细胞表面，确定是否存在同源肽 -MHC 复合体。能使树突细胞和 T 淋巴细胞表面彼此靠近的受体可以促成这一选检过程。淋巴细胞上细胞间黏附分子 3（ICAM-3）被 C- 型凝集素、树突细胞特异性细胞间黏附分子 -3 结合的非整合素（dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin，DC-SIGN）结合。如果在树突细胞表面 T 淋巴细胞受体与肽 -MHC 复合体之间匹配适当，最初的这一相互作用可导致形成免疫突触，其中黏附分子继续巩固黏附事件，并启动激活淋巴细胞内的信号传送。如果 T 淋巴细胞未遇到适合的肽 -MHC 复合体，T 淋巴细胞很可能被释放，另行选择其他的树突细胞。

DC-SIGN 是四聚体穿膜蛋白，含有从 α 螺旋颈部区细胞表面突出细胞表面的 C 端 C- 型糖识别域。这些结构域可与高甘露糖型寡糖、N- 连接寡糖以及各种载有含岩藻糖末端分支结构的聚糖， 如 Lewis^{x} 三糖结合。因此，DC-SIGN 可以结合 ICAM-3 上特异性岩藻糖基化的聚糖。但是，DC-SIGN 也可以结合病毒表面簇聚的甘露糖残基和寄生线虫上富含岩藻糖的聚糖，作为功能性清除剂受体。

DC-SIGN 糖识别域利用基本上与 MBP 相同的单糖初始结合位点。但是，寡糖配体的剩余部分从 MBP 表面突出，结合的寡糖则在延伸的结合位点与 DC-SIGN 糖识别域表面另行接触（图 9.11）。对结合高甘露糖寡糖而言，一级单糖配体为三甘露糖外部分支结构。甘露糖残基被安置在中心部位，因此两分支甘露糖残基处于苯丙氨酸侧链任何一侧。α1-3 连接的甘露糖残基结合在典型的 Ca^{2+} 依赖性结合位点，α1-6 连接的甘露糖残基适宜地结合在苯丙氨酸芳香环另侧二级结合位点。事实上中心部位分支甘露糖残基因为苯丙氨酸侧链与连接在 β 异头体的核心内甘露糖产生了空阻而不能结合糖识别域，才有了对高露糖结构的选择性。有意思的是 DC-SIGN 初始结合位点的甘露糖残基不需要是末端，因为它可以与大分子高甘露糖结构中经常出现的 α1-2 连接的高露糖残基进行延伸。在含有岩藻糖配体，如 Lewis^{x} 三糖情况下，岩藻糖适应了初始结合位点，但另外的一些接触则通过邻近的半乳糖进行。

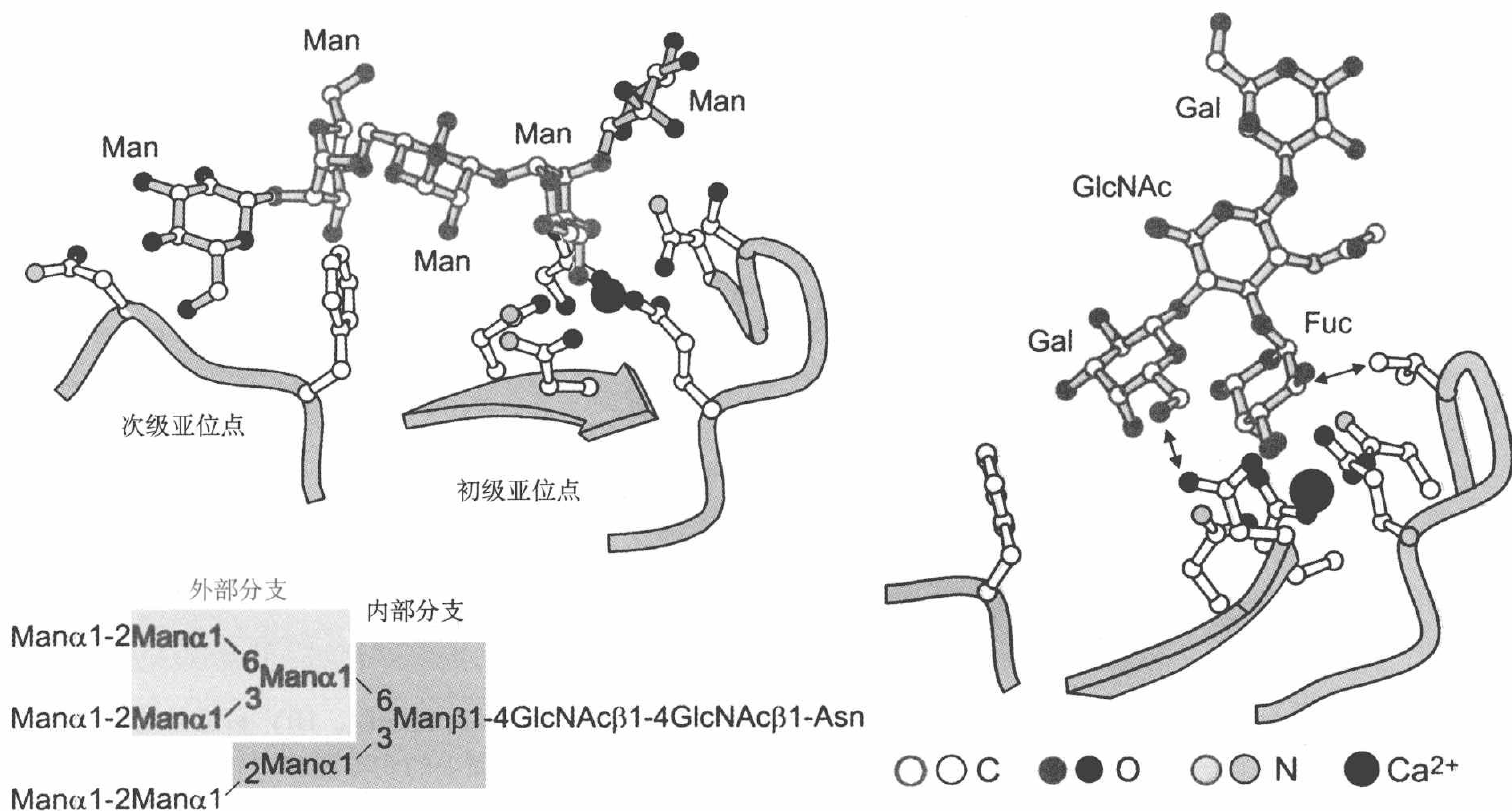


图 9.11 DC-SIGN 中延伸的结合位点，显示高甘露糖型寡糖外臂的三甘露糖分支结构是如何排列在苯丙氨酸侧链侧面亚位点，并说明载有末端岩藻糖残基的分支寡糖如何与糖识别域表面进行二次接触（根据蛋白质数据库 1K9J 条目）

9.8 DC-SIGN 增强 HIV 感染 T 淋巴细胞

糖生物学与疾病人类免疫缺陷病毒

人类免疫缺陷病毒（HIV）利用 DC-SIGN 增强感染 T 淋巴细胞，引发艾滋病。这种受体与病毒表面 N- 连接高甘露糖型聚糖中含量丰富的糖蛋白 gp120 结合。在阴道和肠黏膜中与 HIV 相遇的树突细胞将 HIV 携带入淋巴结，从淋巴结迁移到 T 淋巴细胞表面（图 9.12）。CD4 和辅受体介导 T 淋巴细胞的感染和结合。树突细胞表面的病毒集合体能够长时期地潜伏，成为病毒难以消除的重要原因。虽然 DC-SIGN 能够介导可溶性糖蛋白的胞吞和降解，但病毒既不能被内化也不能返回未受损伤的表面。出现在肝脏内皮细胞、淋巴结和胎盘上的相关受体 DC-SIGNR（DC-SIGN-related protein）也能通过高甘露糖型寡糖与 HIV 和其他几种病毒（包括丙型肝炎病毒和 Ebola 病毒）结合。在胎盘中母体和胎儿细胞上 DC-SIGNR 的出现，表明 DC-SIGNR 可能增强 HIV 的垂直传递。

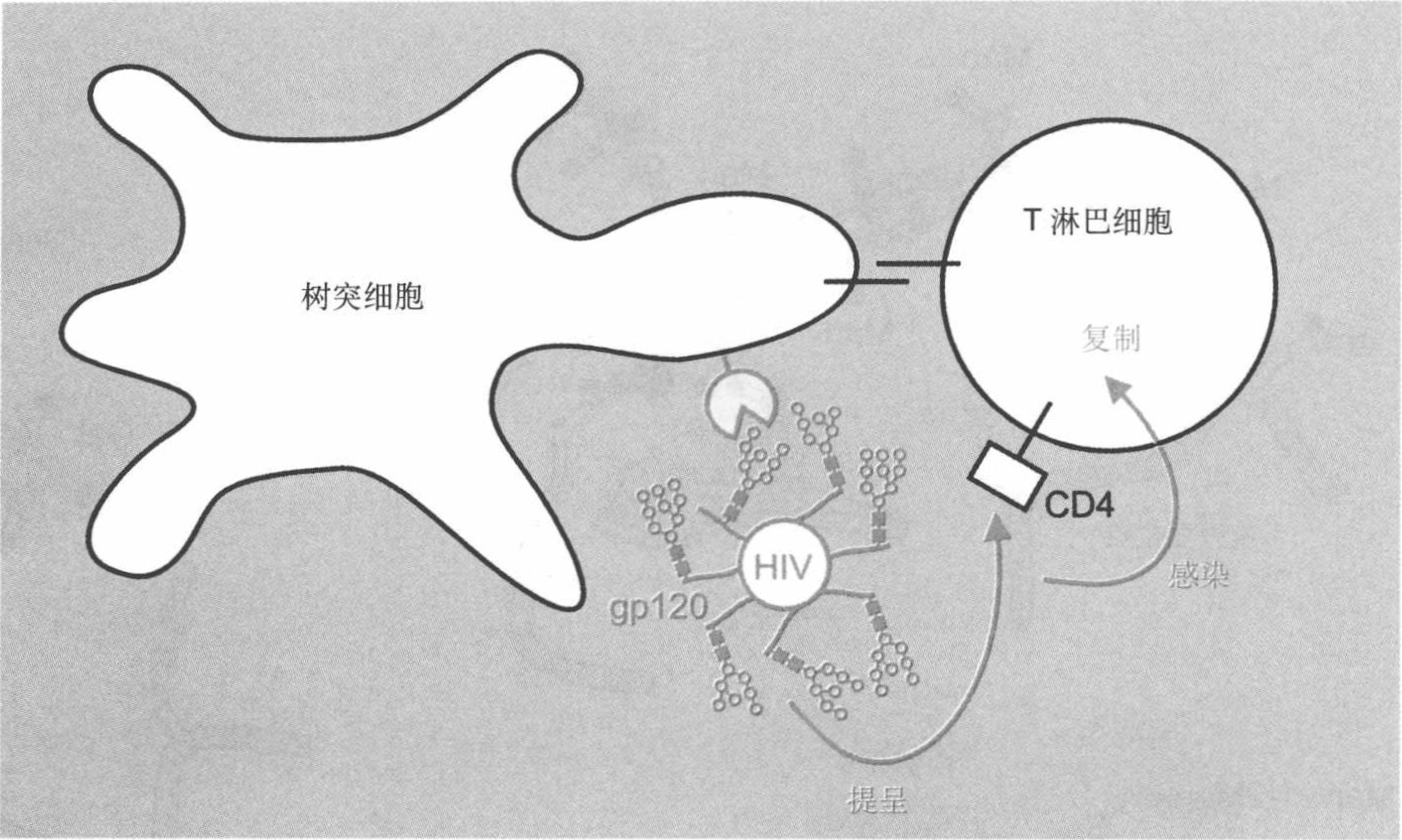


图 9.12　DC-SIGN 和 DC-SIGNR 增强 HIV 感染 T 淋巴细胞。HIV 病毒结合在树突细胞表面，但相互作用不能导致感染。树突细胞表面上的病毒能够有效地转移到 T 淋巴细胞，树突细胞表面的病毒可以高效地转移到具有适合细胞表面，如能够介导感染的 CD4 和趋化因子受体这类分子的 T 淋巴细胞。gp120 分子上的单一聚糖可用于代表载有各种高甘露糖型寡糖的多个 N- 连接糖基化位点

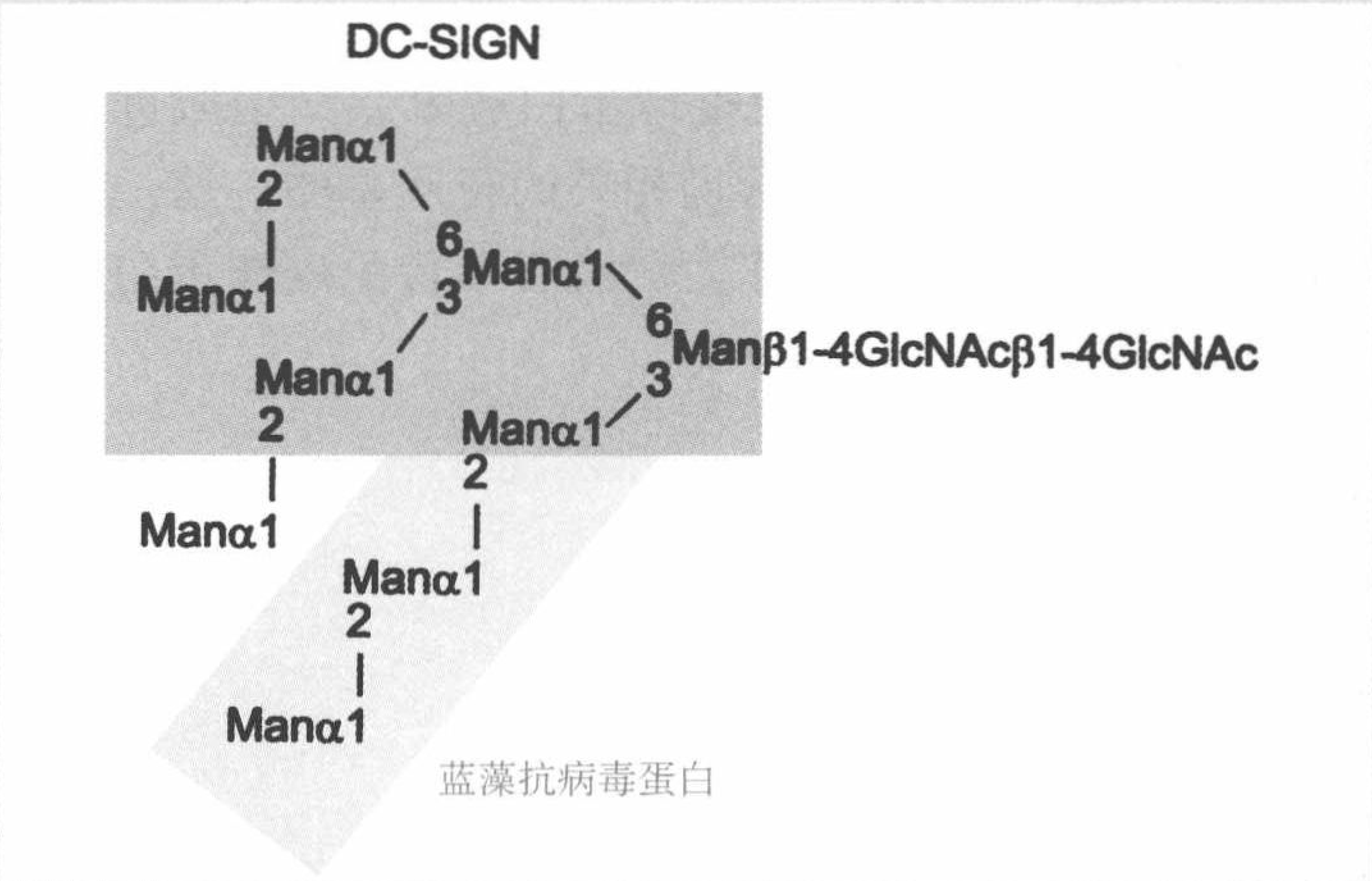
与选凝素的作用进行比较，虽然对 DC-SIGN 的作用还没有了解清楚，但对其特性进行比较，还是很有意义的。选凝素和 DC-SIGN 都参加了细胞之间，或细胞与病毒之间的可逆性黏附事件，但是这些相互作用是在不同背景情况下，是在切变或静态条件下进行的，而且选凝素只与数目有限糖蛋白上表达的复合聚糖配体结合，相对而言，DC-SIGN 则与常见类型聚糖结合。

框 9.1 糖治疗药物：*模拟 DC-SIGN 的识别方式，预防 HIV 感染药物和抗体*

与多数人细胞表面的糖蛋白相比，DC-SIGN 与人类免疫缺陷病毒（HIV）表面 gp120 糖蛋白的相互作用涉及病毒糖蛋白的两种异常性质：蛋白质上高甘露糖型寡糖的间隔密切，和聚糖多为大型的 Man_7、Man_8、Man_9 形式。糖基化反应为免疫系统 gp120 多肽保守部分提供了一种防御机制，也使病毒利用 DC-SIGN 作为输送至淋巴结的运输工具。但是聚糖的这两种异常性质及其高密度已成为研发病毒治疗药物的方向。

在广泛筛选潜能抗菌化合物中，发现了一种与 Man_8 和 Man_9 型聚糖高亲和力结合的小分子蛋白质——蓝藻抗病毒蛋白 -N (cyanovirin-N)。这种蛋白质在组织培养中，

通过防止 gp120 与 CD4 受体结合，阻止 HIV 对 T 淋巴细胞感染。蓝藻抗病毒蛋白 -N 可以与 gp120 上 Man_8 和 Man_9 聚糖结构高亲和力地结合，但是这些聚糖被识别的部分有些不同：Manα1-2Man 末端结构成为蓝藻抗病毒蛋白 -N 的关键结合决定因素，而外部分支结构对于 DC-SIGN 结合至关重要。



阴道和直肠感染模型的组织培养模型临床前检验证实蓝藻抗病毒蛋白能够防止 HIV 感染，近期对猕猴的研究表明，一种抗病毒蛋白阴道凝胶配方制剂也能防止感染。蓝藻抗病毒蛋白能够被局部采用的事实与蛋白质治疗药物的施用和传送方式有关。在这种情况下，蓝藻抗病毒蛋白可能在防止 T 淋巴细胞局部感染和通过防止树突细胞上 DC-SIGN 结合病毒，并向淋巴结中 T 淋巴细胞提呈两方面起作用。

论述题

• 论述 HIV gp120 与蓝藻抗病毒蛋白相互作用中寡糖多价结合的重要意义。

• 蓝藻抗病毒蛋白也是一种蛋白质，为什么它可以作为有潜效的治疗药物。

主要文献

• Botos, I. and Wlodawer, A. (2003). Cyanovirin-N: a sugar-binding antiviral protein with a new twist, *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 277-287.

• Barrientos, L.G., Lasala, F., Delgado, R., Sanchez, A., and Gronenborn, A.M. (2004). Flippingthe switch from monomeric to dimeric CV-N has little effect on antiviral activity, *Structure* **12**, 1799-1807.

• Tsai, C.-C., Emau, P., Jiang, Y., Agy, M.B., Shattock, R.J., Schmidt, A., Morton, W.R., Gustafson, K.R., and Boyd, M.R. (2004). Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infection in Vaginal transmission models, *AIDS Research and. Human Retroviruses* **20**, 11-18.

9.9 I- 型凝集素由免疫球蛋白样结构域组成

含有免疫球蛋白样蛋白质结构域的细胞表面受体，通过与蛋白质或糖配体结合参加各种不同的黏附和信号传送事件。通过免疫球蛋白超家族结构域结合糖配体的受体，被称为 I- 型凝集素（I-type lectin）。将 I- 型糖识别域（I-type CRD）的序列与其他免疫球蛋白超家族结构域进行比较，表明有一组唾液酸结构域，形成一种密切相关的特殊基团。这一基团中的成员称作涎免凝素（siglec），中文全称为唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素，是 I- 型凝集素中最具特征的基团。

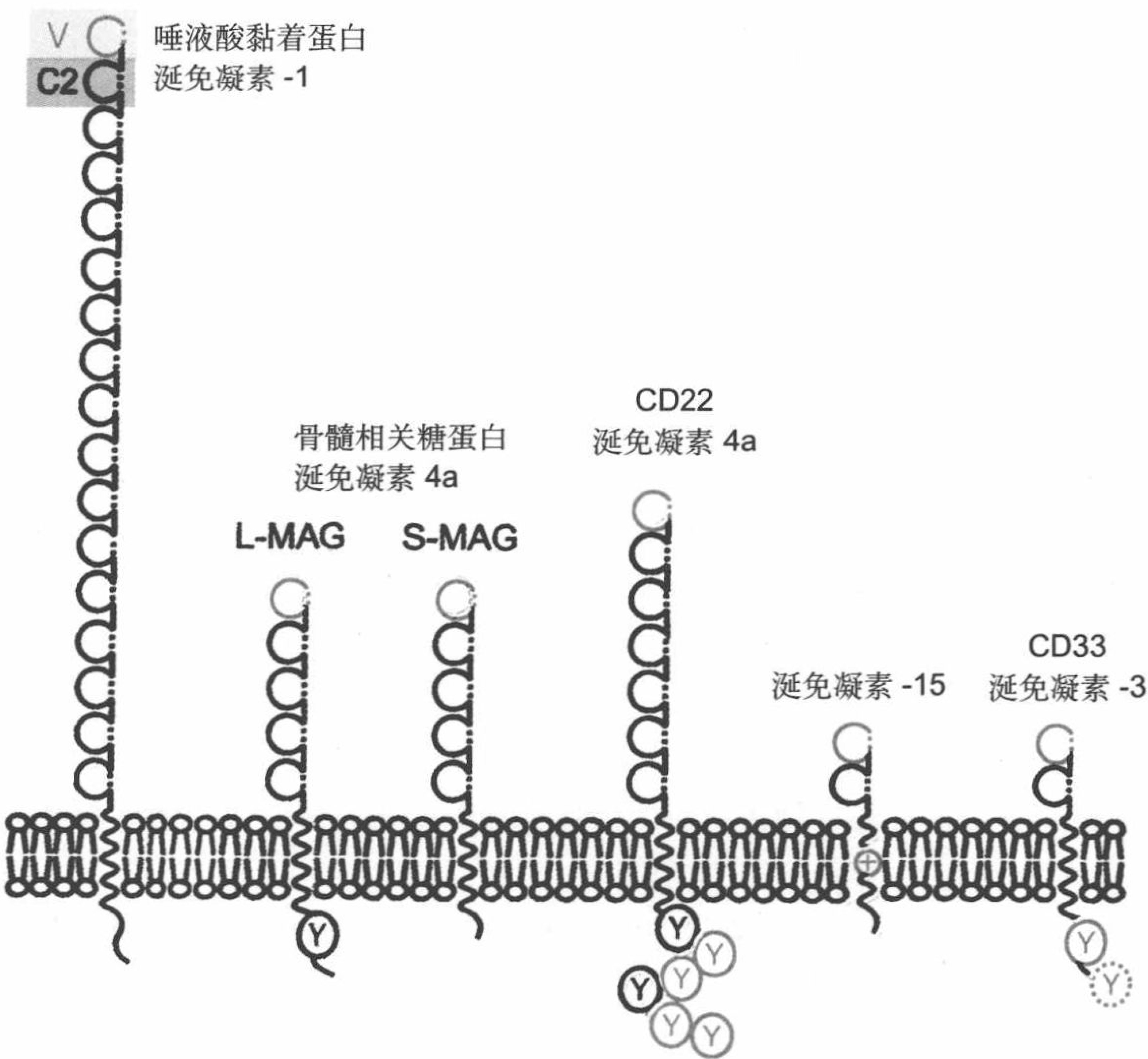


图 9.13 涎免凝素组织图。蓝色表示具有结合配体 V- 组免疫球蛋白结构域，黑色表示 C2 亚型间隔结构域。编码唾液酸黏着蛋白的单一基因、CD22、Mag 和涎免凝素 -15 在人和小鼠中都有发现。CD33 是一密切相关蛋白质亚家族的原型，在小鼠和人中有不同的基因组。已有 9 个人 CD33 相关涎免凝素和 5 个小鼠涎免凝素经过鉴定。用圆内 Y 标志表示一些涎免凝素胞质尾部中含酪氨酸的序列模体。对免疫酪氨酸抑制模体（ITIM）共有序列以蓝色表示，以点线圆表示 CD33 相关涎免凝素变异模体。涎免凝素 -15 不含 ITIM，但能通过在其穿膜域中的赖氨酸残基与含有 ITIM 的衔接物蛋白质 DAP-12 缔合，调制信号传送 [摘自：Crocker,P.R.and Varki, A.(2001) Siglecs, sialic acid and innate immunity. Trends in Immunology, 22: 337-342]

人的 14 个涎免凝素大体上都具有相同整体结构域组织的穿膜蛋白（图 9.13）。在这类蛋白质中，与免疫球蛋白可变（V- 组）和恒定（C- 组）区结构域有关的免疫球蛋白样结构域，具有两种功能。C- 组结构域是从细胞表面突出 N 端 V- 组结构域的间隔序列。V- 组结构域含有唾液酸结合位点。每一涎免凝素的 N 端 V- 组结构域，通过模块之间独特的二硫键与邻近的 C- 组结构域相连。二硫键的出现说明，尽管间隔区结构域的数目不同，但说明涎免凝素之间进化关系密切相关。涎免凝素多数出现在免疫系统细胞上面，可以从唾液酸黏着蛋白（sialoadhesin）和 CD22 讨论中了解到有关涎免凝素的知识。髓鞘相关糖蛋白（myelin-associated glycoprotein）在神经系统中表达。

有关 MAG 参见 12.6 节。

9.10 涎免凝素是免疫系统细胞黏附和信号传送的受体

涎免凝素家族的最大成员，唾液酸黏着蛋白的延伸结构确保末端结合唾液酸的结构域的位置处于细胞表面蛋白和糖的最上部，便于接触胞外基质的其他细胞和成分。唾液酸黏着蛋白优先与半乳糖 α2-3 键中末端 *N*- 乙酰神经氨酸（NeuAc）残基结合，但对越过这一末端结构的聚糖部分选择性很小，事实上对 NeuAcα2-3Gal NAc 和 Neu Acα2-6 Gal 也是低亲和力地结合（图 9.14）。这种相对（广泛的特异性）结合配体，可由免疫球蛋白样末端结构域 NeuAc- 结合位点的结构来解释，在该结构的结合袋中能以很大的选择性容纳 NeuAc，但不能与其唾液酸化配体的剩余部分进行深层的相互作用。唾液酸黏着蛋白中，唾液酸配体的羧基和结合位点中的 Arg-97 侧链之间有两个直接的氢键（图 9.15）。结合位点中相互作用的安排，可以读出唾液酸环周围各取代基的位置。除精氨酸 - 羧基的相互作用外，还有在 4 位、7 位、8 位和 9 位带有羟基和在 C5 连接氮的氢键。色氨酸侧链与 C7-C9 甘油侧链的碳氢主链和 5-N- 乙酰取代基的甲基进行疏水相互作用。虽然对单糖的亲和力与 C- 型 CRD 对单糖配体亲和力同处于相同的毫摩尔范围，但这些相互作用使结合位点对唾液酸具有高度选择性。某些与 CD33 相关的涎免凝素对含有更为复合的唾液酸配体具有更大的选择性（图 9.14）。

还不清楚唾液酸黏着蛋白的确切功能。考虑到唾液酸黏着蛋白具有一般性的亲和力，但有趣的是，它在结合像粒细胞这样的特异性细胞类型时，具有选择性。选择性的产生可能因为某些细胞适宜于表达出现在高浓度配

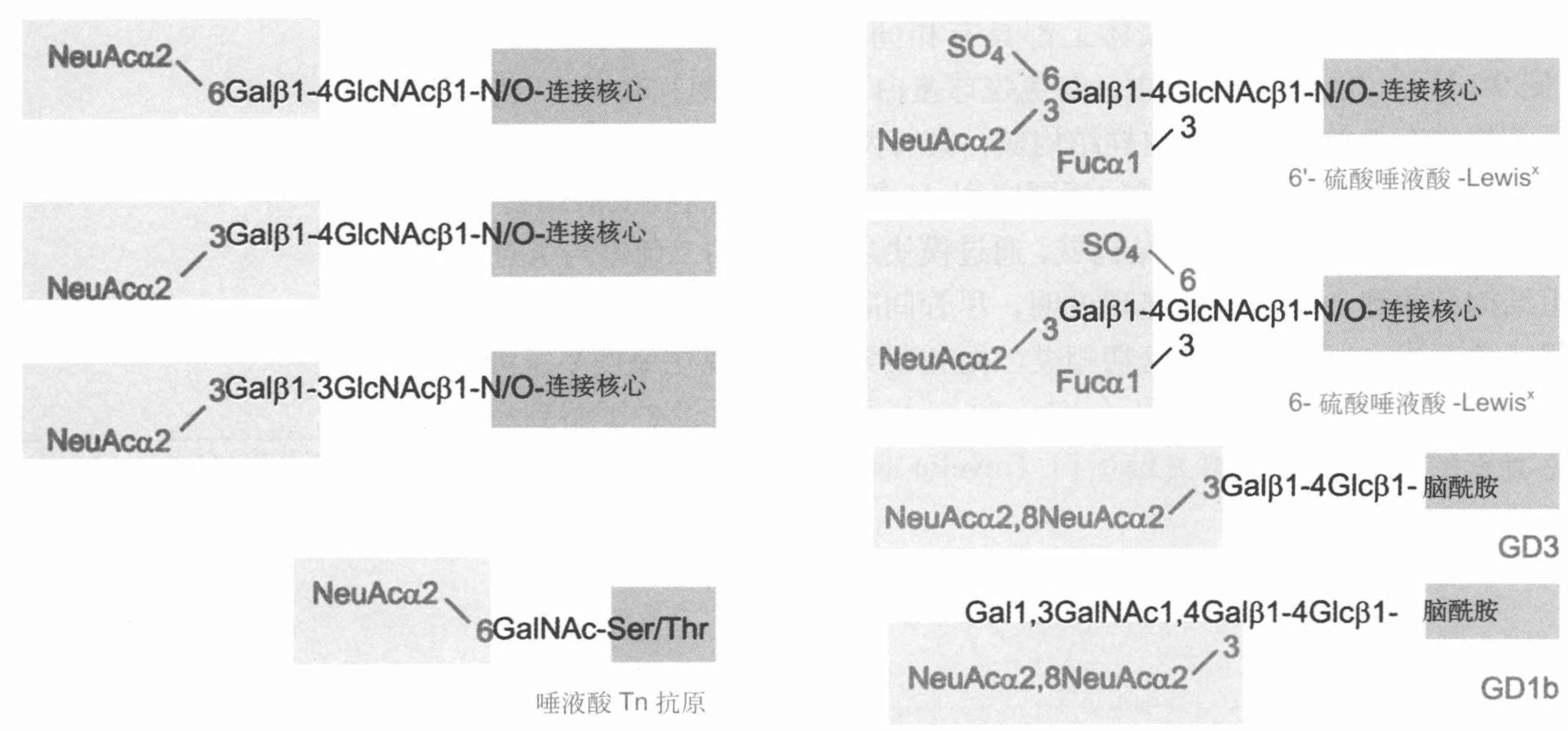


图 9.14　涎免凝素含有唾液酸的配体。唾液酸黏着蛋白和 CD22 可能与连接在糖蛋白的 N- 连接和 O- 连接聚糖结合。某些 CD33 相关涎免凝素能与 6′ - 硫酸唾液酸 -Lewis^x（人涎免凝素 8）、6- 硫酸唾液酸 -Lewis^x（人涎免凝素 9）以及出现在 GD3 和 GD1B（人涎免凝素 7）的二唾液酸模体的特异性配体结合

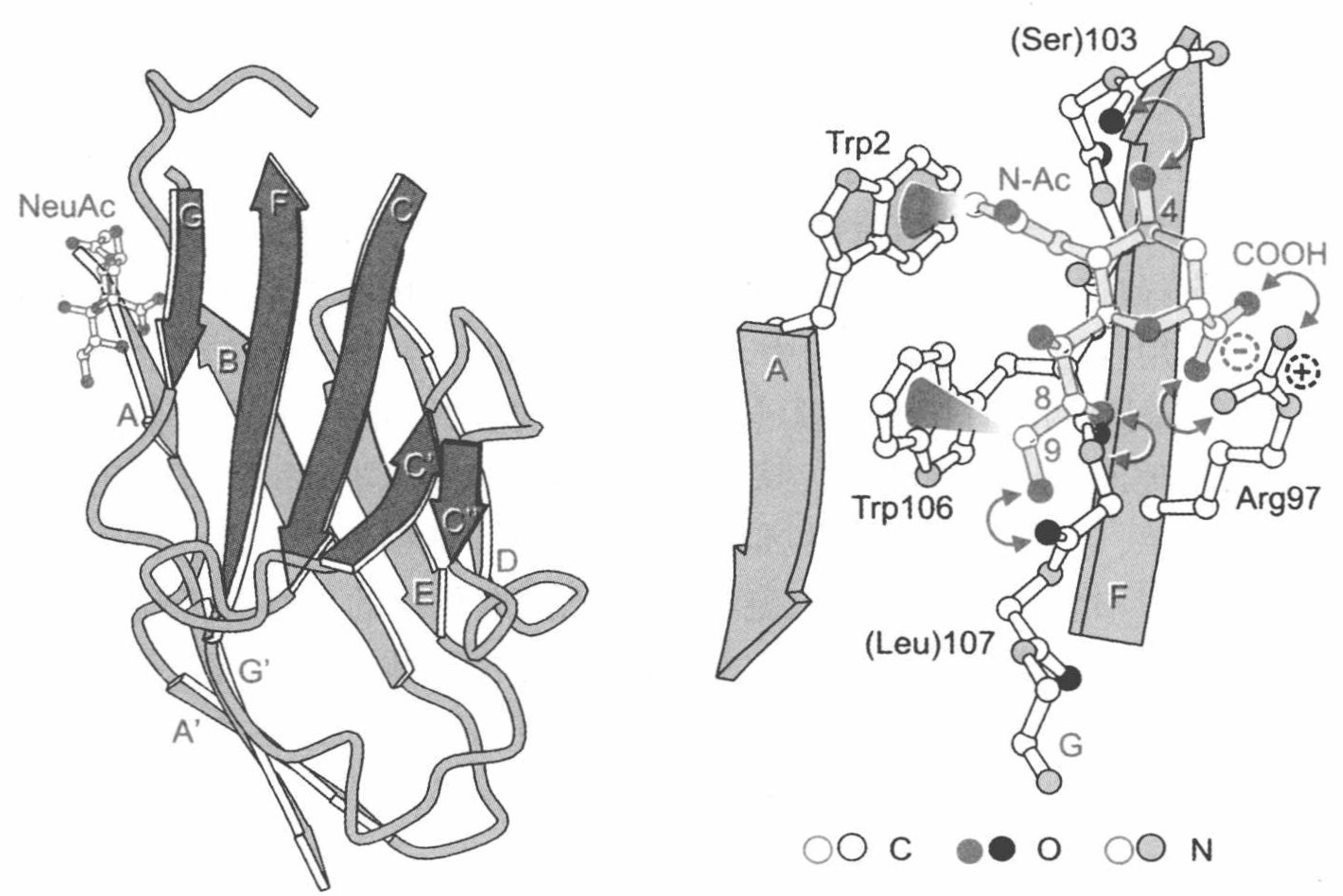


图 9.15　唾液酸黏着蛋白 CRD 整体折叠模式和单糖结合位点。结合位点位于免疫球蛋白结构域的两 β 折叠的边缘区，这种安排形式，便于和唾液酸残基环上的各取代基相互作用（根据蛋白质数据库 1QFO 条目）

体的糖蛋白。这类配体包括黏蛋白和在多个唾液酸化 O- 连接聚糖中含有黏蛋白样结构域的蛋白质。例如，唾液酸黏着蛋白与细胞表面 CD43 分子的 O- 糖基化区，以及与 P- 选凝素糖蛋白配体 1 结合。这些出现在 T 淋巴细胞表面的糖蛋白有助于巨噬细胞 /T 细胞的相互作用。唾液酸黏着蛋白表达模式表明它可能在多种巨噬细胞黏附过程中具有一定的作用，因为在居留于组织的巨噬细胞上，以及在浸润肿瘤和发炎部位的巨噬细胞上都发现了唾液酸黏着蛋白。

◉有关黏蛋白样结构域参见 3.1 节和 3.2 节。

出现在 B 淋巴细胞的一种涎免凝素，CD22 胞质结构域，含有多个可以磷酸化的酪氨酸序列模体，既能激活，也能抑制胞内信号传送级联放大尽管 CD22 对 α2-6- 连接的唾液酸具有选择性，这一配体广泛地分布于可溶性和结合膜的糖蛋白。因此，很难设想胰岛素和胰岛素受体之间是一种简单的配体和受体关系。信号传送很可能是通过相邻细胞表面一系列唾液酸残基与多个 CD22 分子的约定产生的结果。尽管 CD22 具有激活和抑制两种作用的模体，敲除小鼠的表型表明抑制功能占有优势，因为缺失 CD22 的小鼠对细菌性脂多糖的敏感性增加，并出现产生自身抗体增加的趋势。唾液酸常在哺乳动物细胞中出现，但很少出现在细菌和真菌表面，因此，CD22 可能在面临载有唾液酸的细胞作为防止自身反应工具时，具有抑制 B 淋巴细胞激活的功能。在这种情况下，SHP 磷酸酶的募集可能抑制 B 淋巴细胞抗原受体的信号传送（图 9.16）。在白细胞上表达不同涎免

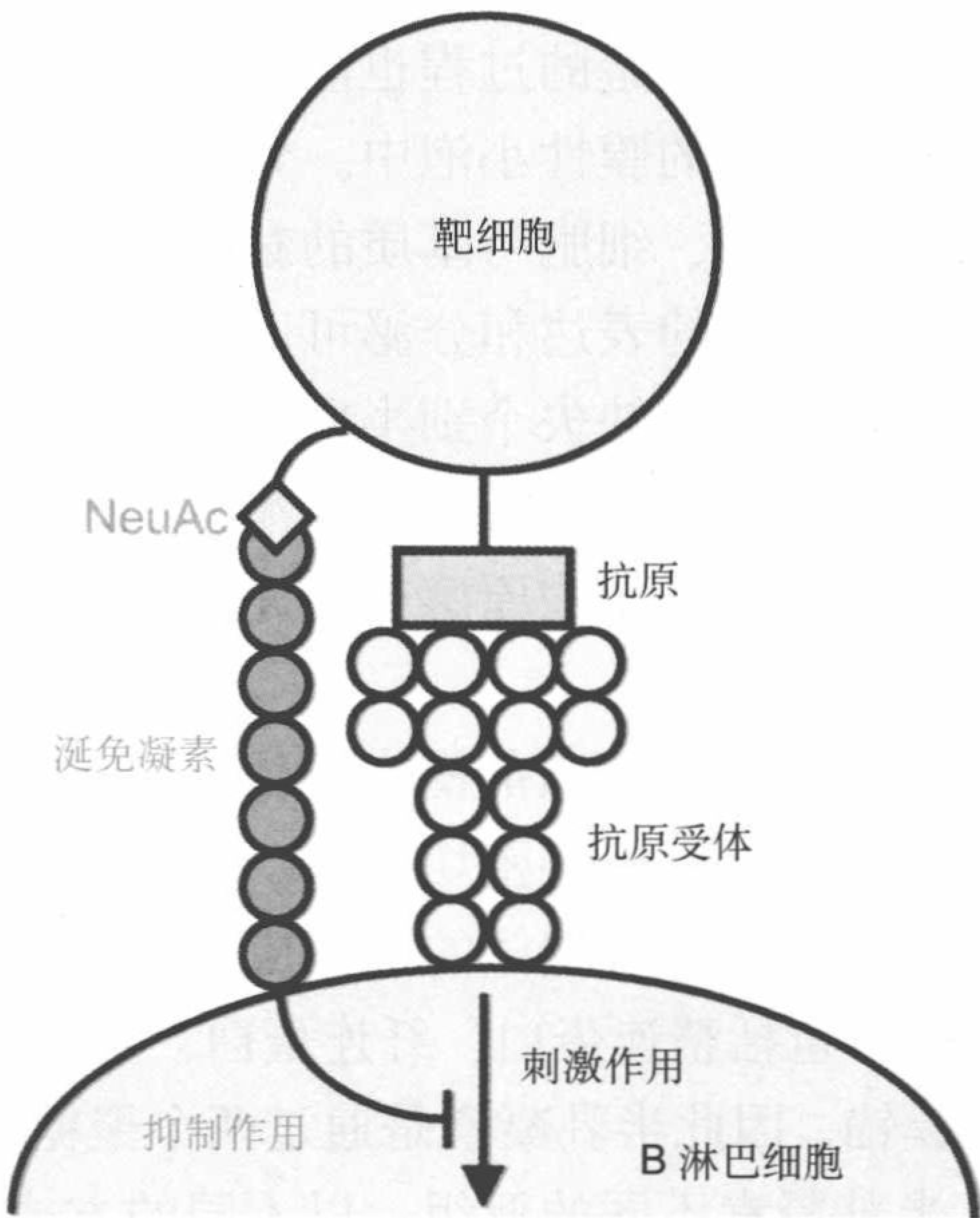


图 9.16 CD22 抑制载有唾液酸细胞反应性时的潜在作用。CD22 与富含唾液酸的表面结合，抑制抗原受体信号传送

凝素的CD33相关亚组成员，也含有抑制SHA磷酸酶募集的模体，表明这些成员也具有调制免疫应答的作用。

CD22还具有作为黏附受体和介导B淋巴细胞归巢至骨髓的功能。由于CD22所含间隔免疫球蛋白结构域少于唾液酸黏着蛋白，其结合位点不会突出细胞表面更远，而且许多B淋巴细胞上面的结合位点常被B淋巴细胞质膜附近含唾液酸的糖蛋白掩盖。有人假设，有些细胞上CD22的结合位点未被掩盖，结合位点未被掩盖的这些细胞，将选择性地迁移至骨髓。但是，还不清楚骨髓内皮上CD22确切的靶配体。CD22对半乳糖或GalNAcα2-6连键的NeuAc残基有很强的选择性，但对具有6-硫酸化的GlcNAc ,α2-6-唾液酸化的6-硫酸-*N*-乙酰乳糖胺（NeuAcα2-6Galβ1-4[6S]GlcNAc）的配体具有很高的结合亲和力。在淋巴组织内皮细胞上发现了含有α2-6-唾液酸化的6-硫酸-*N*-乙酰乳糖胺的糖蛋白，而且可以作为B淋巴细胞归巢中CD22的配体。

9.11 胞外半乳凝素具有细胞黏附和细胞信号传送功能

➡有关细胞核中半乳凝素参见**10.10**节。

半乳凝素（galectin）是可以结合β-半乳糖苷可溶性蛋白的家族，广泛地分布在各种细胞和组织中，并在细胞核内具有某些建议性功能。但是，半乳凝素通过一种尚未了解清楚的过程也能到达细胞表面，半乳凝素在此过程中，被包围在融合质膜的膜性小泡中。分泌的半乳凝素能够介导或调制细胞与细胞间的相互作用、细胞与基质的黏附作用，以及穿膜间的信号传送（图9.17）。半乳凝素的表达和分泌可以调节，表明半乳凝素是在发育过程中特定时期发挥作用。缺失个别半乳凝素敲除小鼠的表型，也表明这些蛋白质是在特定的发育过程中起作用。例如，失去半乳凝素1的小鼠，表面上貌似正常，但其嗅觉系统中原感神经元不能将轴突伸到嗅球的正确部位。

在细胞外面发现许多半乳凝素的潜在配体。这些配体与经常出现在细胞表面和胞外基质上的聚乳糖胺链密切结合。不同的半乳凝素对寡糖表现不同的专一性，但半乳糖是所有配体的当然成分。结合半乳凝素的细胞表面糖蛋白和基质成分，包括整连蛋白、纤连蛋白、层黏连蛋白和腱生蛋白。半乳凝素没有疏水膜锚，因此半乳凝素是通过两个聚糖交联介导黏附事件。为行使这一功能，半乳凝素不同的亚组，以不同的方式获得所需二价结合活性（图9.17）。许多半乳凝素多肽链只含一个糖识别域，但是，这些多

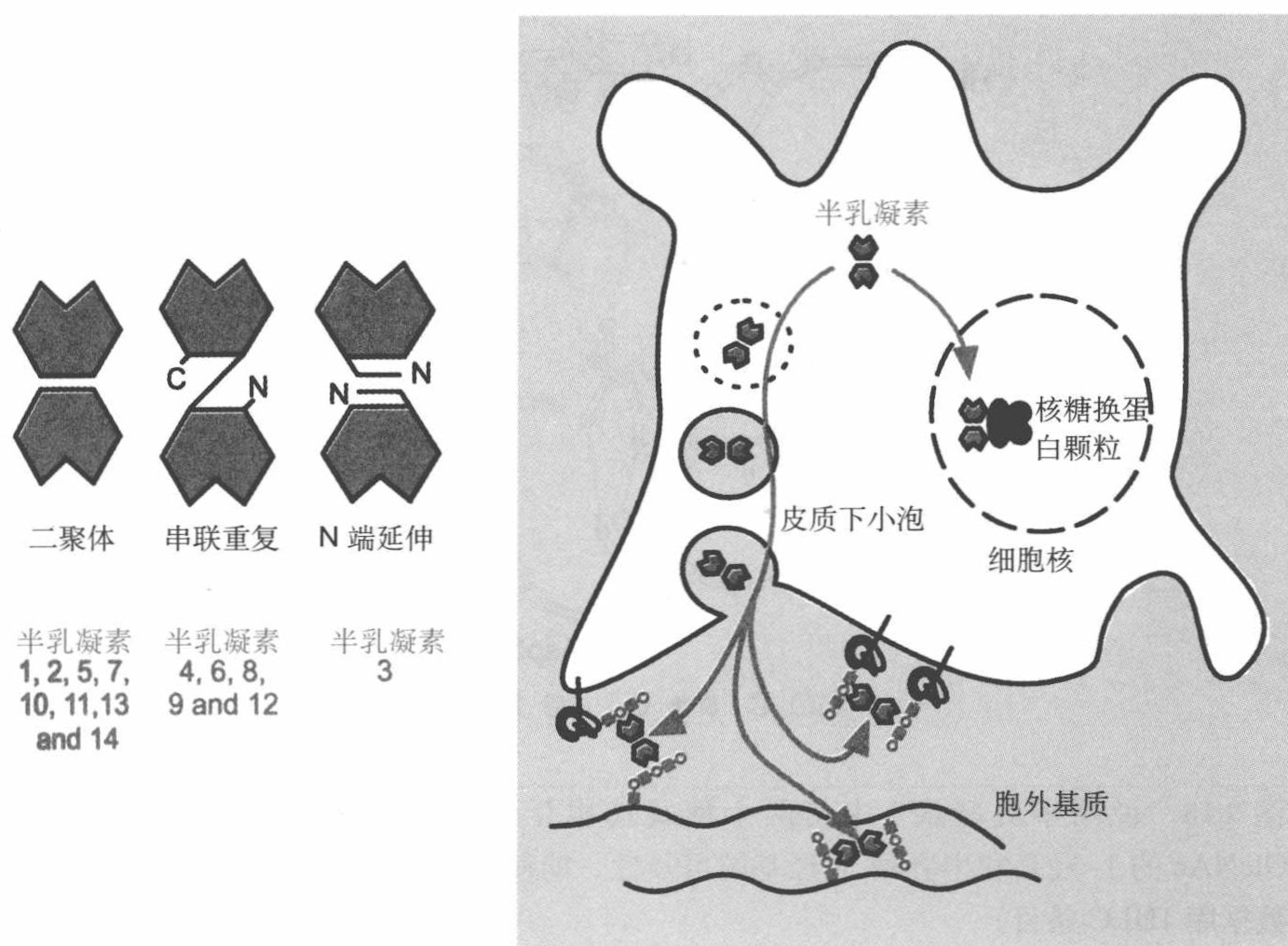


图 9.17 半乳凝素结构和功能概览图。左图表示二价结构形成的不同机制。右图表示半乳凝素在细胞核和细胞表面的作用。图中说明半乳凝素在细胞膜中的可能性分泌机制，包括在小泡内与质膜融合的螯合作用。分泌的半乳凝素与细胞表面和胞外基质中的糖缀合物交联。RNP. 核糖核蛋白

肽链通过糖识别域之间的直接相互作用，形成稳定的二聚体。与之相比，串联式半乳凝素亚组成员，因为在单一多肽链中含有两个糖识别域，它们都是固有的二价体。哺乳动物中，以半乳凝素 3 为代表的半乳凝素第三个亚组，可以通过 N 端延伸进行二聚化。半乳凝素 3 的二聚化与浓度有关，因此，在体内它以单体和二聚体两种形式存在。单体形式的半乳凝素可以通过阻塞其他黏着蛋白质的结合位点进行调制细胞的黏附作用。

虽然半乳凝素能与半乳糖和像 α- 甲基半乳糖苷一类简单的衍生物结合，但对生理上有意义的结合则需要乳糖（Galβ1-4Glc）或 *N*- 乙酰乳糖胺（Galβ1-4GalNAc）二糖的存在。半乳凝素中的结合位点，基本上形成一种沿配体两糖残基边缘连续性的结合表面（图 9.18）。在半乳糖残基 B 面和保守的色氨酸残基之间，除包装疏水相互作用之外，还有氢键与两个糖残基，有的还包括与 3 位和 4 位的特征性羟基的相互作用。虽然这些相互作用并不包括前面例子中观察到的针对芳香环的包装疏水相互作用，与乳

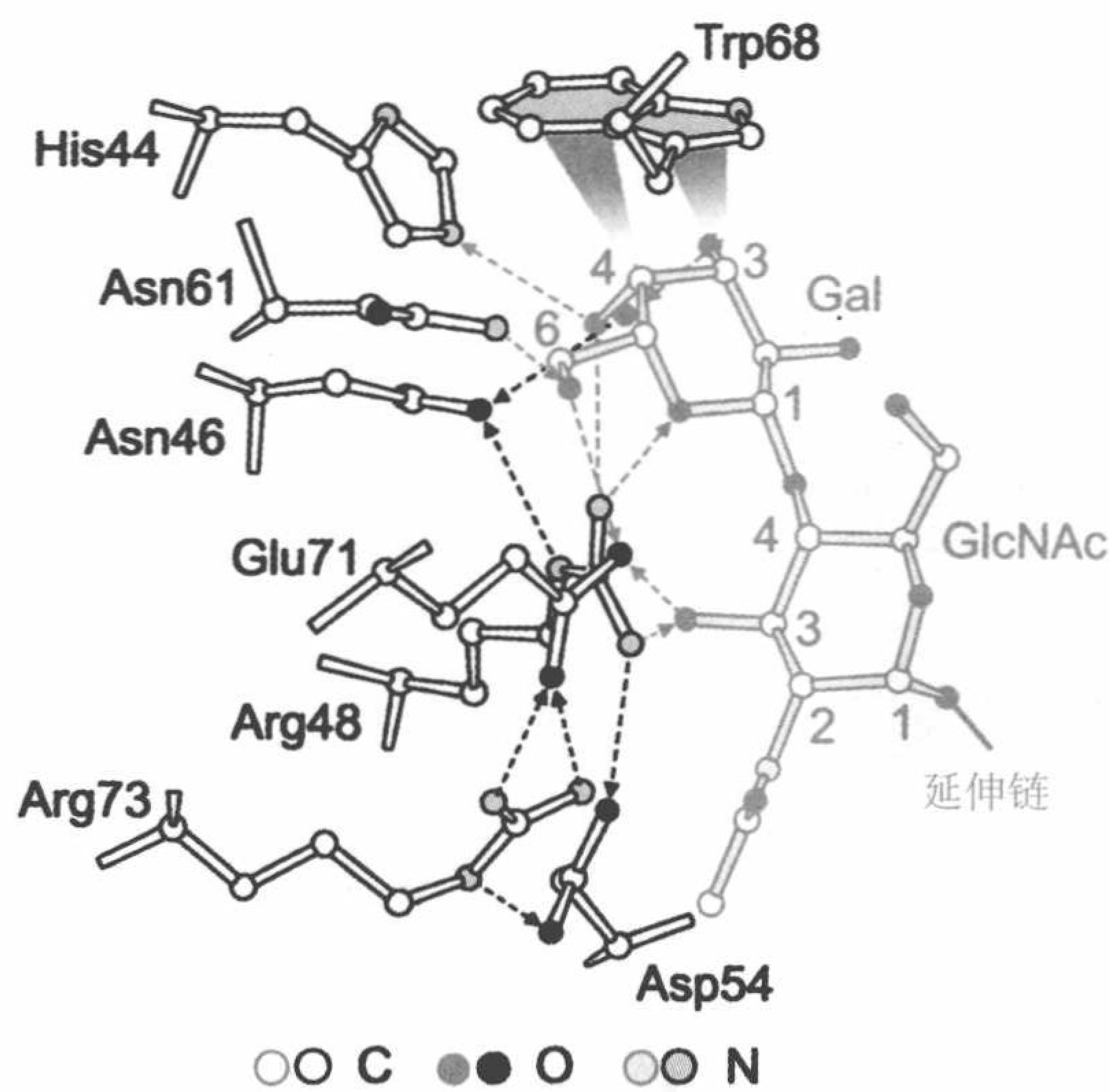


图 9.18　说明半乳凝素 1 中与两个糖残基相互作用的 Galβ1-4GalNAc 结合位点。GlcNAc 的 1- 羟基和半乳糖 3- 羟基的可及性，能使多乳糖胺链双向延伸（根据蛋白质数据库 1HLC 条目）

糖相比，半乳凝素对 Galβ1-4GlcNAc 的高亲和力可能产自万德瓦尔斯力与 2- 乙酰胺取代基的相互作用。GlcNAc 残基的 1- 羟基基团指向远离的半乳凝素表面，以便 *N*- 乙酰葡糖胺基团被容纳在结合位点。这种安排形式与半乳凝素与这一结构末端的多乳糖胺链具有高亲和力的情况相符。

有趣的是，因为两结合位点从二聚体相反端部延伸，半乳凝素寡聚体的几何形状与结合甘露糖蛋白质的几何形状迥然不同（图 9.19）。这种形式的几何形状能使半乳凝素在两聚糖之间形成桥键。这种交联活性与细胞表面和周围基质之间的联系有关，或者与质膜中糖蛋白之间形成一定距离有关。

9.12　半乳凝素调控 T 淋巴细胞的激活并通过触发和抑制细胞凋亡控制细胞存活

有关 GlcNAc 转移酶 V 参见 2.6 节。

半乳凝素除在发育中起作用外，还在免疫系统起作用。例如，半乳凝素 3 交联通过细胞表面网格中结合的 T 淋巴细胞受体和其他糖蛋白，可以抑制 T 淋巴细胞激活（图 9.20）。缺失 GlcNAc 转移酶 V，并因此导致 N- 连接聚

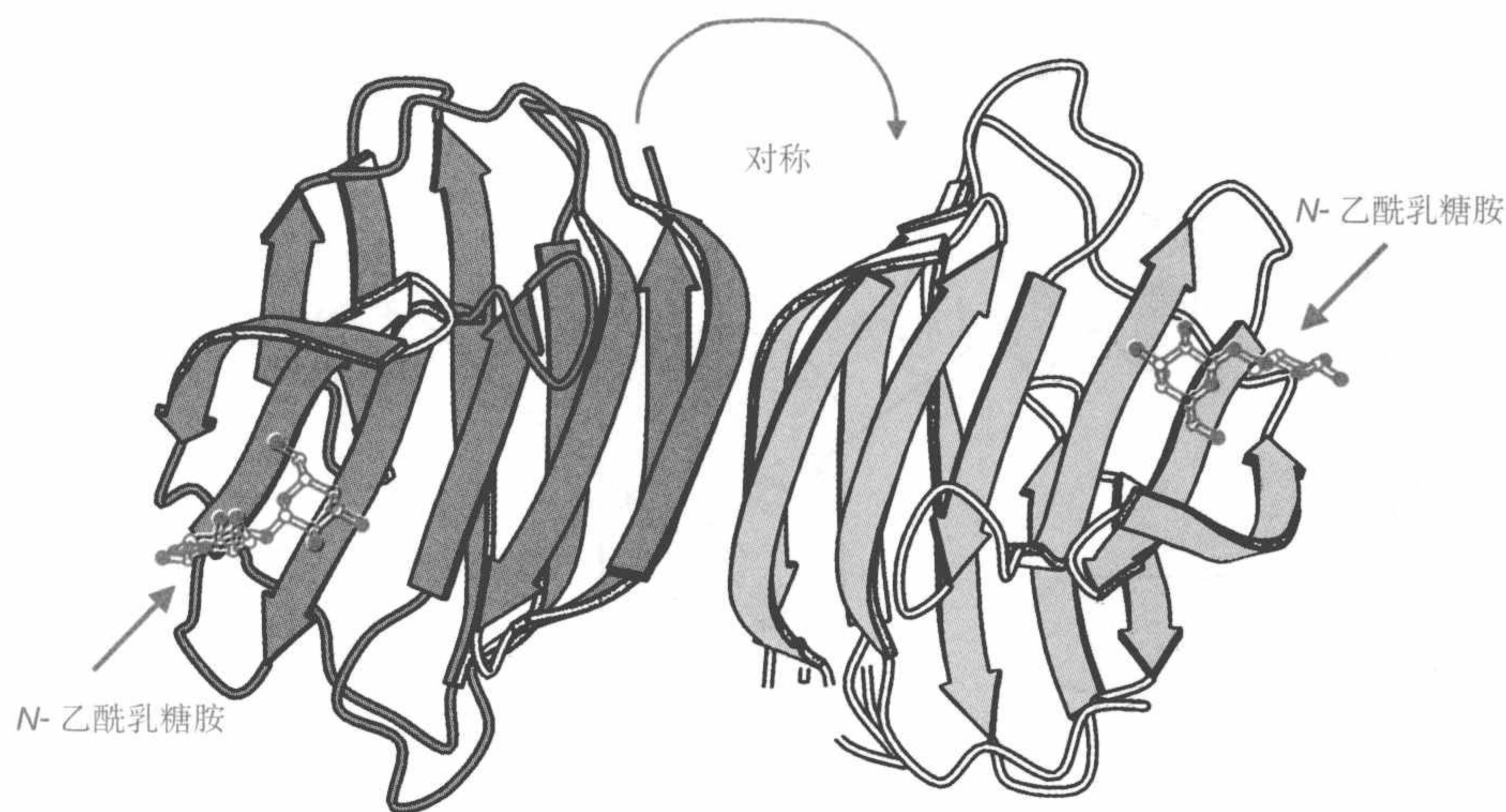


图 9.19 半乳凝素二聚体结构。结合的二糖位于分子对面的端部，可作为聚糖之间的桥键（根据蛋白质数据库 1HLC 条目）

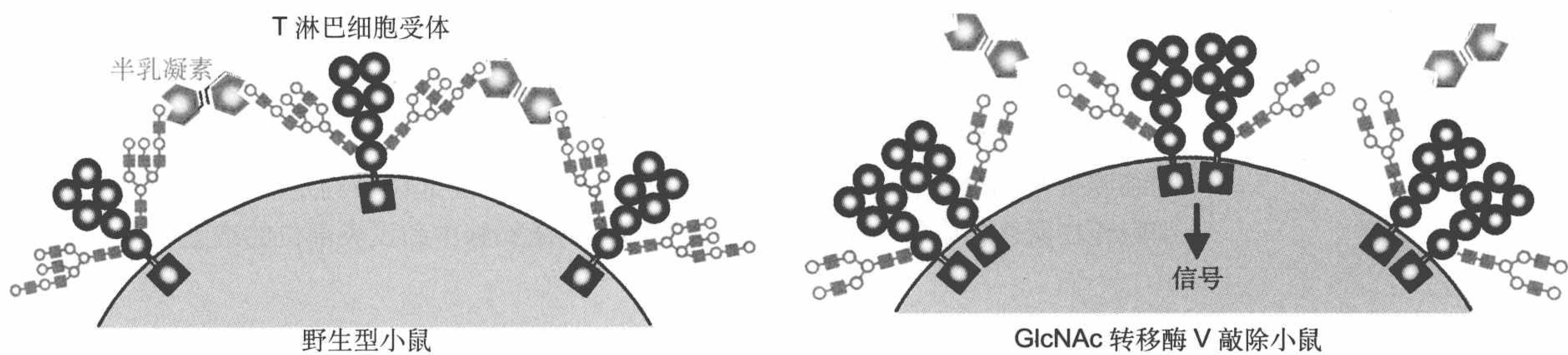


图 9.20 半乳凝素 3 阻抑 T 淋巴细胞激活。由半乳凝素 3 形成的聚糖交联，可保持 T 淋巴细胞受体分子间隔分离。在 GlcNAc- 转移酶敲除小鼠中，不能合成作为 T 淋巴细胞受体上半乳凝素 3 配体的多乳糖胺链，因此 T 淋巴细胞受体分子可以簇聚和激活淋巴细胞。图中多乳糖胺链已被缩短

糖上多乳糖胺链缺陷的小鼠，表现出易染自身免疫性疾病和产生过敏性 T 淋巴细胞。T 淋巴细胞敏感性的增强，是由糖缺乏性细胞上 T 淋巴细胞受体成簇的增强引起的。采用半乳凝素配体乳糖（但不能采用不结合半乳凝素的其他糖类）预处理野生型细胞，可能诱发一种类似于具有增强 T 淋巴细胞受体成簇的表型。 因此，T 淋巴细胞糖蛋白上缺失半乳凝素 3 糖配体，或者出现结合半乳凝素的竞争者，都会妨碍网格的形成，造成 T 淋巴细胞受体不适当地簇聚，甚至在没有抗原提呈的情况下，产生不合时宜的信号传送。

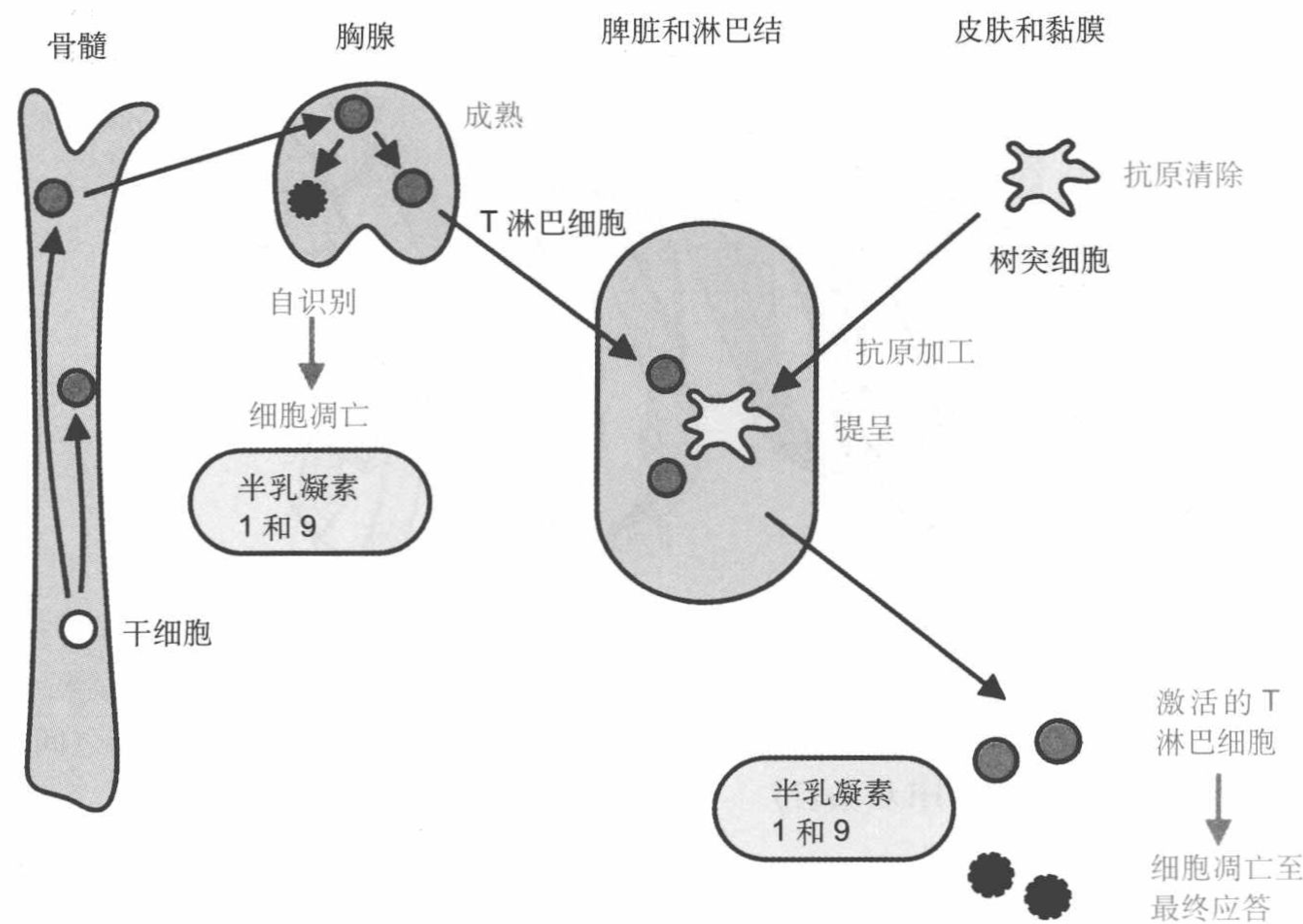


图 9.21　T 淋巴细胞凋亡中半乳凝素的功能。胸腺细胞从骨髓中迁移至胸腺，其中自反应性细胞在胸腺因凋亡被消除。在脾脏和淋巴结中，一种亚型 T 淋巴细胞识别由树突细胞提呈的外来抗原。当这类细胞在外周组织发炎部位被约定的抗原激活之后，因细胞死亡而终结应答。半乳凝素 1 和 9 可以刺激胸腺中和发炎部位的细胞凋亡

半乳凝素通过其触发或抑制程序性的细胞凋亡能力也参与免疫系统的调制（图 9.21）。半乳凝素 1 和 9，这两个串联型半乳凝素，通过质膜中的交联配体，可以诱发 T 淋巴细胞凋亡。细胞凋亡在 T 淋巴细胞在两个发育阶段非常重要。在胸腺 T 淋巴细胞成熟和选择过程中，表达自反应性受体的胸腺细胞和不能重排功能性 T 淋巴细胞受体的胸腺细胞，遭受凋亡。当 T 淋巴细胞迁移至外周组织被激活后，通过细胞凋亡杀死抗原特异性 T 淋巴细胞，终结特殊抗原的应答。许多因素参与了细胞凋亡过程，但半乳凝素 1 和 9 可能是 T 淋巴细胞发育两阶段刺激细胞死亡的主要因素。这两个半乳凝素在选择 T 淋巴细胞的胸腺中，和在激活抗原特异性 T 淋巴细胞的外周组织中表达，表明这两个半乳凝素可以杀死未成熟的和激活的 T 淋巴细胞。半乳凝素 1 与 T 淋巴细胞上表达的几种蛋白质结合，但是 CD7、CD43、CD45 都是参与刺激细胞凋亡的配体。在这些蛋白质上，半乳凝素 1 介导核心 2 型 O- 连接聚糖的交联，使它们在细胞膜中簇聚，启动触发细胞凋亡的胞内信号传送途径。在发育过程中，通过改变糖基转移酶的表达，

●有关聚糖和 T 淋巴细胞发育参见 **12.8** 节。

调控 T 淋巴细胞上半乳凝素 1 配体核心 2 型 O- 连接聚糖的表达。核心 2 聚糖经常在选择阶段未成熟胸腺细胞糖蛋白细胞表面上和激活 T 淋巴细胞的糖蛋白上出现，导致它们对半乳凝素 1 诱发的细胞凋亡非常敏感。成熟的胸腺细胞和原初 T 淋巴细胞不表达核心 2 型 O- 连接聚糖。

与刺激细胞凋亡的半乳凝素 1 和 9 相比，半乳凝素 3 可以抑制细胞凋亡。以几种不同类型转染细胞系，包括转染人白血病 T 淋巴细胞系进行的实验表明，半乳凝素 3 超表达细胞的生长速度高于对照细胞，并具有抗细胞凋亡的能力。但半乳凝素 3 是在胞内起抑制凋亡作用，而不是在细表面通过糖蛋白交联抑制细胞凋亡。有意义的是很多肿瘤细胞都高水平地表达半乳凝素 3，表明这种半乳凝素可能是这类细胞无抑制生长的主要原因。

小　结

通过结构多样化，识别多样聚糖的凝集素，可以介导细胞黏附和信号传送。凝集素系统的一个共同特征是经常参与细胞间彼此相对移动的短暂相互作用。与第 10 章讨论的生物过程相比，由细胞表面凝集素 - 聚糖相互作用介导的生物过程都是近代进化的。缺失本章讨论的个别类型凝集素的小鼠可以存活，但在发育或免疫系统将遭遇异常病患。这些小鼠的表型证实了凝集素识别事件在哺乳动物细胞间真正和谐相互作用中的重要性。

主要参考文献

Bleijs, D. A., Geijtenbeek, T. B.H., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2001). DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand, *Trends in immunology* **22**, 457-463. 这是一篇关于树突细胞通过与 ICAM-2 和 ICAM-3 结合，介导 T 淋巴细胞黏附作用中 DC-SIGN 作用证明的短评论性文章。

Crocker, P. R. ,Paulson, j. C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system, *Nature Reviews Immunology* **7**, 255-266. 这一论文和 McMillan 和 Crocker(2008)(见下) 的论文为延免凝素的生物化学和生物学性质作了一次全面的概述。

Epperson, T. K., Patel, K. D., McEver, R. P., and Cummings, R. D. (2000). Noncovalent association of P-selectin glycoprotein ligand-l and minimal determinants for binding to P-selectin, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7839-7853. 这一重要实验界定了 P- 选凝素与其生理配体之间相互作用。

Garner. O. B. and Baum, L. G. (2008). Galectin-glycan lattices regulate cell-surface

glycoprotein organization and signalling, *Biochemical Society Transactions* **36**, 1472-1477. 论述了甘露糖结合蛋白的性质及其在免疫系统中的功能。

Ip, W. K. E. , Takahashi, K. , Ezekowitz, R.A., and Stuart, L. M. (2009). Mannose-binding lectin and innate immunity, *Immunological Reviews* **230**. 9-21. 证明糖蛋白交联半乳糖凝素生物学功能的评判性评论文章。

Khoo, U. -S. , Chan, K. Y. K. , Chan, V. S. F. , and Lin, C. L. S. (2008). DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection, *Journal of Molecular Medicine* **86**, 861-874. 论述 DC-SIGN 和 DC-SIGNR 促使病素感染的文章。

May, A. P. , Robinson, R. C. , Vinson, M. , Crocker, P. R. , and Jones, E.Y.(1998). Crystal structure of the N-terminaI domain of sialoadhesin in complex with 3'-sialyllactose at 1. 85 Å resolution, *Molecular Cell* **1**, 719-728. 被延免凝素结合的唾液酸的分子基础。

McMillan, S. J. and Crocker, P.R. (2008). CD33-related sialic-acid-binding immunoglobutin-likelectins in health and disease, *Carbohydrate Research* **343**, 2050-2056. 参见上文 Crocker 等 (2007) 的文章。

Nitschke,L. (2009). CD22 and Siglec-G: B cell inhibitory receptors with distinct functions, *Immunological Reviews* **230**, 128-143. B 淋巴细胞信号传送中 CD22 的作用。

Rini, J. M. (1995). Lectin structure, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **24**, 551-577. 这篇论文与由 Weis 和 Drickamer(1996)(见下) 的论文详细评论了通过晶体学测定动物凝集素结构及以蛋白质 - 糖相互作用为基础的原理。

Rosen, S. D. (2006). Homing in on L-selectin, *Journal of Immunology* **177**, 3-4. 对导致发现 I- 选凝素和其他选凝素的重要实验的评价性论文，并界定其在白细胞运输中的作用。

Somers, W. S. , Tang, J. , Shaw,G. D. , and Camphausen, R. T.(2000). Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P-and E-selectin bound to SLe^x and PSGL-1, *Cell* **103**, 467-479. 两种与唾液酸 -$Lewis^X$ 复合选凝素的 C- 型糖识别结构域 (CRD) 的晶体结构描述。

Sperandio, M. , Gleissner, C. A., and Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking, *Immunologicaf Reviews* **230**. 97-113. 详细评论了免疫细胞运输中一些选凝素及其配体和其他凝集素 - 聚糖相互作用的可能功能。

Stahl, P. D. and Ezekowitz, R. A. B. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense, *Current Opinion in Immunology* **10**, 50-55. 这篇论文对免疫系统甘露糖受体的性质及其可能的功能进行了概要性论述。

Steinman, R.M. (2000). DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells, *Cell* **100**, 491-494. 这一简短评论文概要地介绍了免疫系统中树突细胞的功能和 DC-SIGN 的可能性作用。

Taylor, M. E. and Drickamer, K. (2007). Paradigms for glycan-binding receptors in

cell adhesion, *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 572-577. 目前对不同聚糖结合受体如何参与细胞黏附理解的评判性文章。

Uchimura, K. , Gauger, J. -M., Singer, M. S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., von Andrian, U. H., and Rosen, S. D. (2005). A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deftcient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules, *Nature Immunology* **6**, 1105-1113. 对两种磺基转移酶敲除小鼠表型的分析，表明硫酸化唾液酸 -Lewis^{X} 在淋巴细胞归巢中的重要性。

Van der Merwe, P. A. (1999). Leukocyte adhesion：high-speed cells with ABS, *Current Biology* **9**, R419-R422. 评论了白细胞黏附中选凝素 - 配体相互作用的动力学性质。

Van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B. H. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens, *Nature Reviews Immunology* **3**, 697-709. 详细评论了 DC-SIGN 与病原学微生物的相互作用。

Van Kooyk, Y. and Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses, *Nature Immunology* **9**, 593-601. 详细评论了多种不同类型聚糖结合蛋白在调节免疫应答中的作用。

Wallis, R. , Shaw, J M., Uitdehaag, J., Chen, C. -B., Torgersen, D., and Drickamer. K. (2004). Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannosebinding protein：indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14065-14073. 通过人甘露糖结合蛋白引发免疫缺陷的分子基础的重要实验。

Weis, W. I. and Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate interaction. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 441-473. 参见 Rini(1995)(见上) 论文。

Weis, W.I. , Taylor, M. E. , and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system, *Immunological Reviews* **163**, 19-34. 关于 C- 型凝集素结构和功能及其在免疫系统中作用的论述，还包括甘露糖结合蛋白、其他胶原凝集素、甘露糖受体和选凝素，以及天然杀伤细胞 (K 细胞) 上 C- 型凝集素样蛋白。

Yang, R.-Y., Rabinovich, G. A. , and Liu, F. -T. (2008). Galectins：structure. function and therapeutic potential, *Expert Reviews in Molecular Medicine* **10**, e17. 对半乳凝素家族全体成员的结构和可能功能进行了综述性报道。

习　题

9.1 讨论免疫系统糖识别的各种作用。

9.2 访问 www.imperial.ac.uk/research/animallectins/ 网站，检索动物凝集素基因组资源。在 C- 型凝集素样结构域（CTLD）数据库中，首先查看含有 CTLD 的哺乳动物蛋白质结构域组织，然后检查 Ⅱ 组（Ⅱ 型受体）和 V 组（NK 受体）中 CTLDs 的序列。叙述为什么受体中有些受体预计不与糖结合，而其他一些却有望与甘露糖或半乳糖结合。

参考文献：Drickamer, K. (1992). Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein, *Nature* **360**, 183-186

Weis, W.I., Drickamer, L., and Hendrickson, W.A. (1992). Structure of a C-type mannosebinding protein complexed with an oligosaccharide, *Nature* **360**, 127-134.

9.3 讨论生物过程中识别唾液酸的重要意义，详述过程中涉及的受体和配体。

9.4 描述已用于鉴定选凝素糖蛋白配体的一些方式、方法。

参考文献：Fiegar, C.B., Sassetti, C.M., and Rosen, S.D. (2003). Endoglycan, a member of the CD34 family, functions as an L-selectin ligand through modification with tyrosine sulfation and sialyl-Lewis^x, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 27390-27398.

Hernandez Mir, G., Helin, J., Skarp, K.-P., Cummings, R.D., Makitie, A., Renkonen, R., and Leppanen, A. (2009). Glycoforms of human endothelial CD34 that bind L-selectin carry sulfated sialyl-Lewis^x capped O- and N-glycans, *Blood* **114**, 733-741.

Levinvitz, A., Muhlhoff, J., lsenmann, S., and Westweber, D. (1993). Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells, *Journal of Cell Biology* **121**, 449-459.

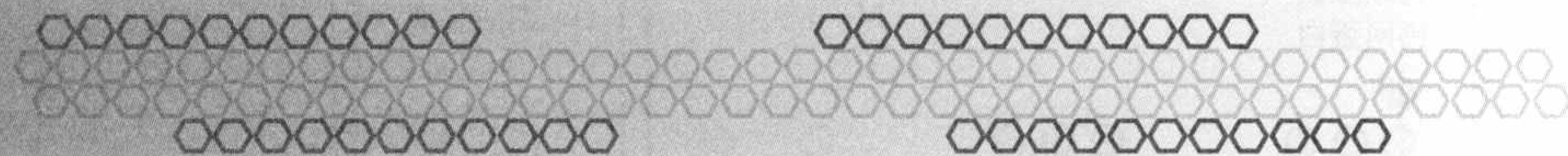
9.5 比较 C- 型凝集素和半乳凝素的结构和功能。

9.6 有人曾设想唾液酸黏着蛋白参与了巨噬细胞的黏附相互作用，但至今对其功能仍无定论。假如有证据表明唾液酸黏着蛋白具有病原体受体的功能，在这样一篇论文中你将进行怎样的实验，提出你的意见。

参考文献：Jones, C., Virji, M., and Crocker, P. (2003). Recognition of sialyleted meningo-coccal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to nehanced bacterial uptake, *Molecular Microbiology* **49**, 1213-1225.

糖蛋白在细胞和生物体中的运行

10



学习目的

学习本章后应知内容：

1. 钙连蛋白和钙网蛋白以及 M- 型凝集素在内质网糖蛋白生物合成质量控制中的作用
2. 甘露糖 6- 磷酸受体和其他凝集素对糖蛋白靶向胞内特异位置的功能
3. 从循环系统选择性清除糖蛋白的机理
4. 糖识别域不同家族糖结合机制的共同特征

多数凝集素都是膜整合性蛋白质，因此糖识别域（CRD）都定位于胞外或腔内空间。这种定位形式表明胞外和腔内区室凝集素与聚糖的结合具有相同的配置。这一章专门讨论凝集素通过识别内源性聚糖在糖蛋白运输中的功能。胞内凝集素通常识别糖蛋白共有的，和在生物合成早期出现的核心糖结构，而且这些凝集素通过分泌途径控制糖蛋白的流动。细胞表面的凝集素通常与生物合成后期设计的易变末端糖结合，并且能从循环系统选择性地摄取亚类糖蛋白。

10.1　凝集素在分泌途径中具有重要作用

分泌的 N- 连接糖基化和细胞表面糖蛋白常被描绘成不可逆的翻译后末端修饰。实际上，这些聚糖在糖蛋白通过分泌途径的迁移过程中，一直进行重复修饰。这种短暂形式的聚糖常用作细胞内部分拣事件的把柄。在通过胞内区室迁移运输中，在完成特定部位糖基化的初始功能后，最后的聚糖可能成为分泌过程中的重要副产物。在以后各节讨论的至少有 4 种支配胞内糖蛋白运输的凝集素（图 10.1）。

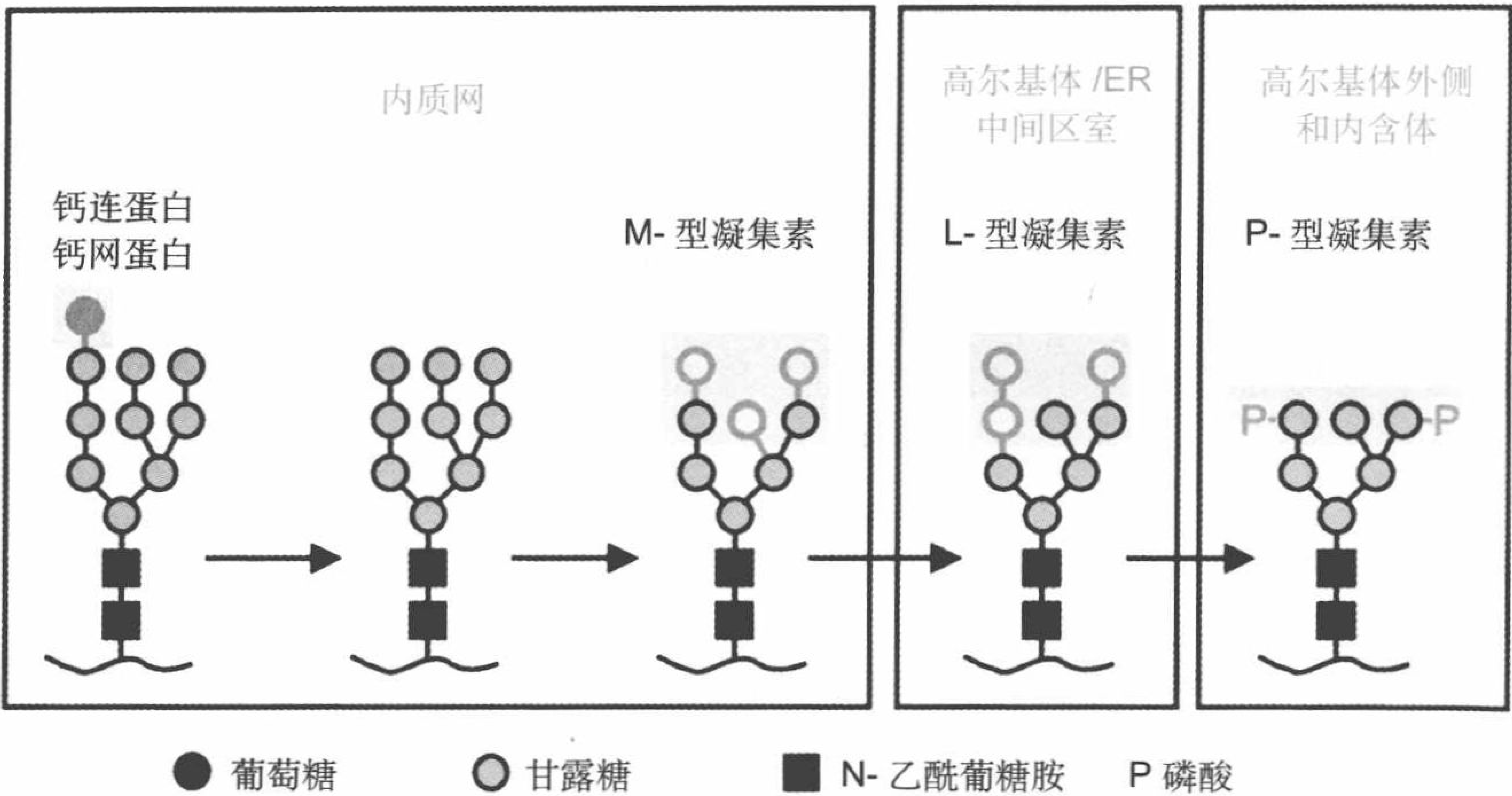


图 10.1 糖蛋白通过腔内区室到达细胞表面过程中，分拣分泌和膜糖蛋白的凝集素。蓝色表示与这类凝集素相互作用的末端残基。ER. 内质网

10.2 钙连蛋白和钙网蛋白有助于内质网内糖蛋白的折叠

内质网腔内的一种可溶性蛋白质——钙网蛋白，与其同系物膜结合钙连蛋白，一同作为质量控制部分，保证蛋白质预定在细胞表面正确折叠。钙连蛋白和钙网蛋白都与单葡糖基化形式的 N- 连接寡糖结合。这种形式的 N- 连接寡糖是从最初转移到新生多肽的聚糖中，清除两个葡萄糖残基产生的。

有关聚糖生物合成步骤参见 2.4 节和 2.5 节。

钙连蛋白和钙网蛋白与蛋白质二硫化物异构酶家族成员 ERp57 缔合（图 10.2）。ERp57 可以协助糖蛋白折叠，但这种糖蛋白必须形成二硫键。钙连蛋白和钙网蛋白结合的最后一个葡萄糖残基，可能从 N- 连接聚糖上清除，导致糖蛋白释放。另外，由于平衡结合过程，糖蛋白从钙连蛋白或钙网蛋白解离时，葡萄糖残基也可以被修剪掉。在这两种清除方式中，释放的未糖基化多肽，根据多肽的状态，可以有两种途径。如果多肽折叠正确，可以继续向前移动进入高尔基体。但是，如果多肽有未折叠部分，糖蛋白就是腔内葡糖基转移酶的底物，重新葡糖基化聚糖，成为钙连蛋白和钙网蛋白的配体。当下一次糖蛋白被释放时，重新结合的糖蛋白可以与 ERp57 和其他折叠因子相互作用获得正确的折叠状态。钙连蛋白和钙网蛋白虽然与不同的（可以是重叠的）分泌和膜糖蛋白相互作用，两者的功能似乎相同。

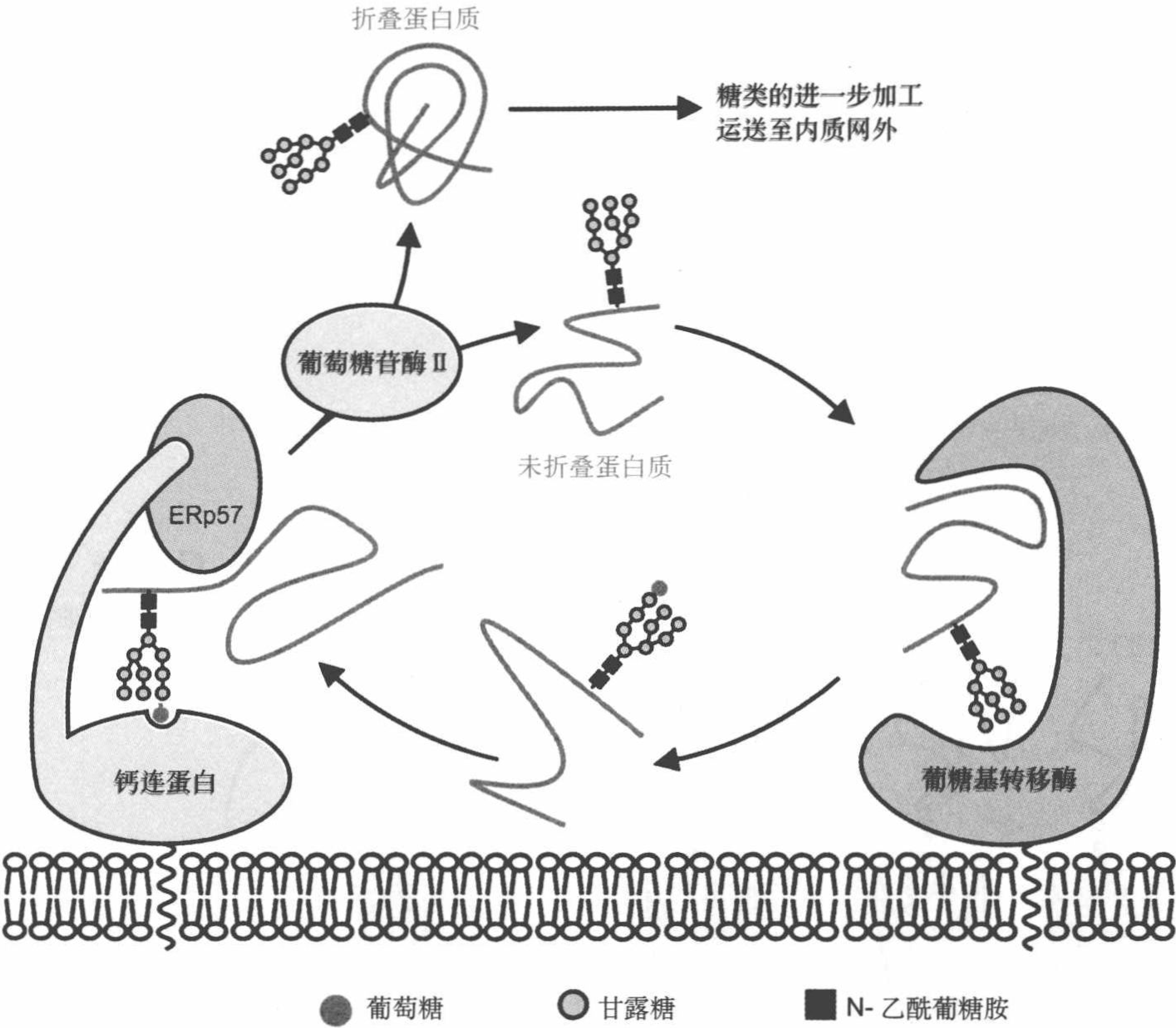


图10.2 钙连蛋白循环图。载有末端葡萄糖残基的糖蛋白保留在内质网内，由ERp57折叠因子催化折叠。葡萄糖一旦被糖苷酶Ⅱ清除，正确折叠的糖蛋白可以运送至内质网外，但葡糖基转移酶可将葡萄糖重新与错折叠糖蛋白结合，以便被钙连蛋白结合

这一完整循环的结果是由钙连蛋白和钙网蛋白将糖蛋白保留在内质网内，并将它们提呈给 ERp57 折叠因子，一直达到正确折叠。葡糖基转移酶的作用是区别折叠的和未折叠的蛋白质的状态。这种酶，除有一催化结构域外，还有一种与暴露在部分折叠糖蛋白表面疏水膜片相互作用的传感结构域，然而，完全折叠蛋白质的极性表面不能进行这种相互作用。钙连蛋白和钙网蛋白分别由一折叠成 β 夹层结构的球形域和由插入球形域链间的反平行多肽环形成的延伸臂组成。糖的结合位点位于球形域内，而 ERp57 与延伸臂结合，也可以与底物糖蛋白相互作用。

10.3 凝集素参与错折叠糖蛋白的降解

清除葡萄糖残基之后，N- 连接糖蛋白生物合成途径中下一个加工事

件是从 Man_9 寡糖中间支链清除 α1-2 连接的甘露糖末端残基留下 Man_8。内质网甘露糖苷酶 I （ERMan I）催化这一反应。在此反应之后，多数蛋白质都从此向前输送到高尔基体，继续进行复合聚糖精细末端的加工（图10.3）。但是错折叠糖蛋白在内质网膜中遇到一种触发内质网相关蛋白降解（endoplasmic reticulum-associated protein degradation, ERAD）反应的凝集素。ERAD 反应过程包括错折叠糖蛋白易位到胞质和被也能降解错折叠

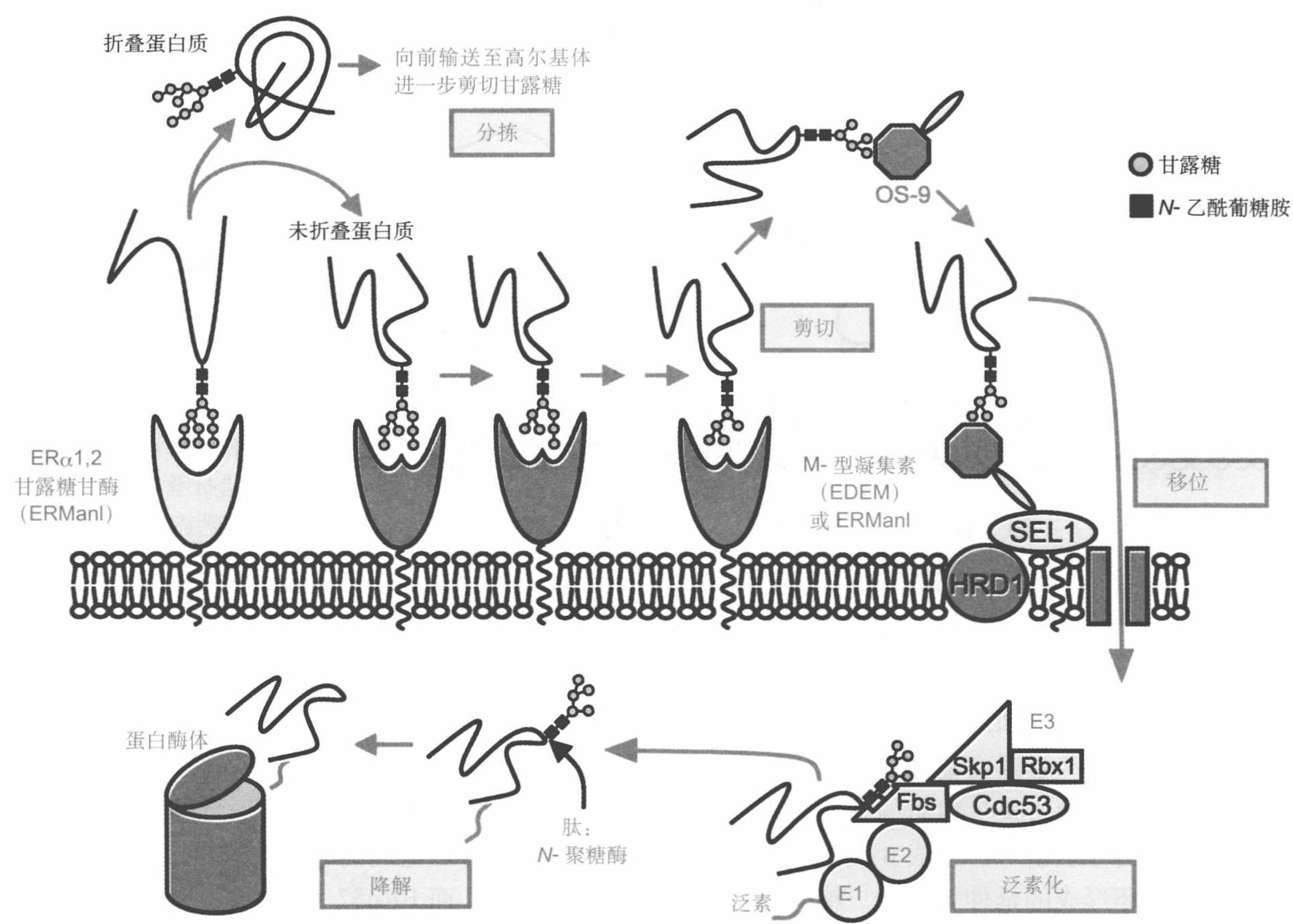


图 10.3 ERAD 和 M- 型凝集素、OS-9 的作用。内质网 α1-2 甘露糖苷酶 ERMan- I，在折叠和未折叠糖蛋白上生成 Man_8 聚糖。在 M- 型凝集素（EDEM1、EDEM2、EDEM3）的辅助下，ERMan- I 从未折叠糖蛋白的聚糖剪除增加的甘露糖残基，导致被 OS-9 识别，错折叠糖蛋白逆向易位至细胞质。在胞质中，结合糖的 F-box 蛋白质，形成酶复合体 E3 泛素连接酶组成的一部分，糖蛋白被标以泛素标签，然后导向蛋白酶体进行降解

胞质蛋白质的蛋白酶体消化。例如，在热激应力情况下，ERAD 途径上调，其中错折叠蛋白质浓度增加。同样情况，未完全折叠的突变蛋白质成为降解机构的良好底物。

哺乳动物细胞中 ERAD 反应过程包括清除大多数或全部 α1-2 连接的甘露糖残基。触发 ERAD 需要清除 $Man_8$1-6 臂上连接 α1-2 的甘露糖。因此，缓慢剪切整理甘露糖残基对内质网中错折叠糖蛋白的识别提供了一种定时器机制。错折叠糖蛋白靶向 ERAD 至少涉及两类凝集素。EDEM1、EDEM2、EDEM 3，这些 M- 型凝集素（M-type lectin）在结构上是与加工甘露糖苷酶——ERMan Ⅰ相关的甘露糖苷酶样蛋白质。另一组结构不同的凝集素，包括含有与甘露糖 6- 磷酸受体（mannose 6-phosphate receptor）P- 型糖识别域（P-type carbohydrate-recognition domain）相同序列结构域的 OS-9（参见 10.6 节）。EDEM1、EDEM 2、EDEM 3 和 OS-9 都是内质网的定居者，并在应激条件下上调。EDEM 1 或 EDEM 3 的超表达，可能是因为 EDEM 1 和 EDEM 3 甘露糖苷酶活性微弱，导致错折叠糖蛋白的去甘露糖基化和降解作用增强。但是，这种活性并未在分离的蛋白质上得到证实。OS-9 与 α1-6 连接末端甘露糖残基的 $Man_{5\text{-}7}$ 聚糖结合，并与含有泛素连接酶 HRD1 大型膜复合体部分的膜蛋白质 SEL1 和 ERAD 底物易位定义尚不清楚的穿膜孔缔合。

对 ERAD 的一种建议性模型是，在 EDEM 辅因子或作为活性甘露糖苷酶的协助下，由 ERMan Ⅰ清除不能折叠成天然构象糖蛋白上 α1-2 连接的甘露糖残基。产生的 $Man_{5\text{-}7}$ 结构被 OS-9 结合，并由 OS-9 将其投送至 HRD1-SEL1 复合体，易位至细胞质（图 10.3）。另外，是与 SEL1 聚糖的相互作用，而不是与错折叠糖蛋白的作用需要 OS-9 凝集素的活性。因此，虽然 N- 连接聚糖和甘露糖参与糖蛋白降解中的剪切已广泛地被接受，但 ERAD 确切的机制仍未揭示清楚，留下了许多疑问：由哪些酶清除增加的甘露糖残基，哪种蛋白质识别错折叠糖蛋白和参与 ERAD 底物易位至内质网膜的是哪些蛋白质。

错折叠糖蛋白一旦被易位返回胞质，被标以泛素（ubiguitin）标签，使其成为蛋白酶体的底物。一系列的酶可以催化赖氨酸残基上泛素的添加反应。第一次识别靶蛋白质，募集 E1 泛素活性酶和 E2 泛素缀合酶之后，E3 泛素连接酶催化激活泛素的转移作用。有多种不同类型的 E3 泛素连接酶可以识别各种蛋白质的底物。有一种 E3 连接酶，通过识别 N- 连接聚糖，专一性地靶向糖蛋白。神经元细胞专一性的 Fbs1 和广泛表达的 Fbs2 连接酶是一组出现在称为 SCF 复合体 E3 连接酶中结合糖的 F-box 蛋白质。每一个 SCF 复合体，由 3 个共同的蛋白质成分（Skp1、cul1 和 Rbx1）和一

个决定底物的专一性 F-box 蛋白组成。F-box 蛋白质，通过 F-box 结构域与 Skp1 结合，并通过各种有关的结构域结合蛋白质底物。Fbs1 和 Fbs2 与 *N*-连接聚糖核心中的两个 GlcNAc 残基结合后，启动糖蛋白的泛素化反应。糖蛋白上添加泛素后，在蛋白酶体中的去糖基化多肽降解之前，由一种肽——*N*- 连接聚糖酶清除聚糖。

10.4 L- 型凝集素从内质网输送糖蛋白到高尔基体

通过鉴定证实，这种定义为内质网 - 高尔基体中间区室（endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment, ERGIC）的蛋白质可能在内质网出现，但在细胞的不同区域浓缩。最具这种蛋白质特征的是膜结合凝集素 ERGIC-53，或简缩地称为膜标志蛋白（53kDa）。ERGIC-53 与载有含甘露糖寡糖的糖蛋白相互作用，但对从内质网向高尔基体移动的蛋白质的高甘露糖型寡糖表现出广泛的专一性。由于 ERGIC-53 是在内质网和区室之间循环，它起着介导区室之间输送糖蛋白货运受体的作用（图 10.4）。

糖生物学与疾病血凝缺陷

ERGIC-53 在输送某些特异性糖蛋白中的作用已通过对人 ERGIC-53 基因突变影响得到证实，这种突变影响是由凝固因子 V 和Ⅷ的血清水平下降导致血凝缺陷引发的。在功能性 ERGIC-53 缺失的情况下，经分泌途径输送这种高度糖基化的凝固因子的质和量都非常低，导致血清水平降低。在基因型受影响的个体中不存在全身性糖蛋白分泌障碍，表明只是在运输特异性亚型糖蛋白时，才需要 ERGIC-53。

VIP36（vesicular integral membrane protein of 36kDa,VIP36）是第 2 个在 ERGIC 中发现，并与含有甘露糖糖蛋白结合的凝集素。VIP36 在 ERGIC 和高尔基体内侧之间循环。据推测 VIP36 参与这两区室之间的糖蛋白迁移，但对这一作用未进行深入的研究。ERGIC-53 和 VIP36 在结构上都具有与豆科植物凝集素（legume lectin）相关的腔内结构域（参见第 11 章），并因此被称为 L- 型凝集素（L-type lectin）。第三个 L- 型凝集素——VIP36 样蛋白质（VIP36-like protein, VIPL）定居于内质网，当它从钙连蛋白 - 钙网蛋白中释放后，可能立即与折叠的糖蛋白结合。

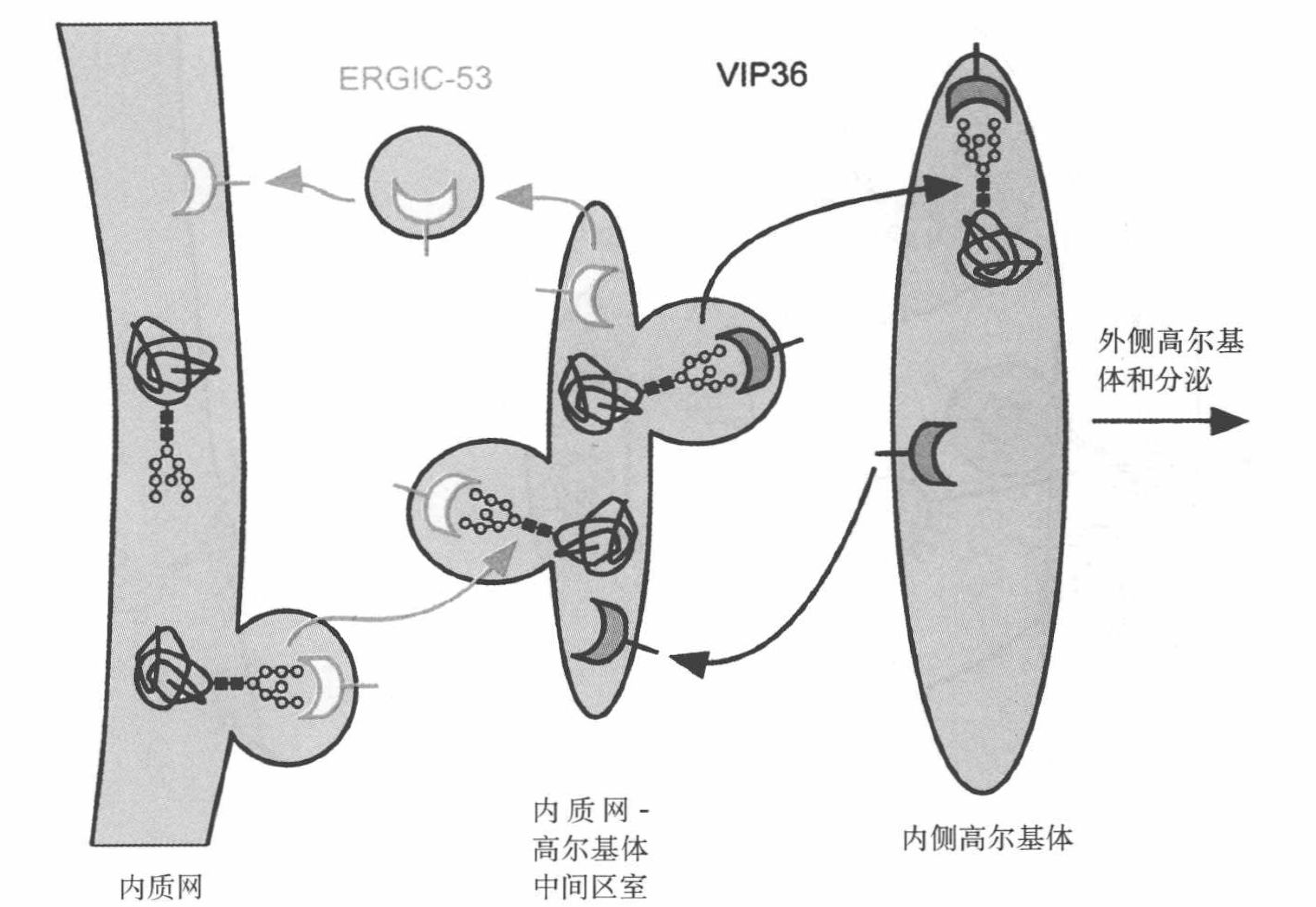


图 10.4 L-型凝集素 ERGIC-53 和 VIP36 的运输方式。这些凝集素介导选择的载有高甘露糖型寡糖糖蛋白进出内质网（ER）-高尔基体中间区室

10.5 甘露糖 6-磷酸残基使溶酶体酶导向溶酶体

溶酶体蛋白酶、核酸酶、糖苷酶和其他水解酶对被送至溶酶体进行降解的分子具有催化作用。溶酶体水解酶与分泌的糖蛋白在粗面内质网内一起合成。为防止从细胞中释放有害的酶，须有一种有效的方法将新合成的水解酶导向溶酶体。由预定前往溶酶体酶寡糖链上的甘露糖 6-磷酸残基（mannose 6-phosphate residue）介导这一过程。

在易位进入内质网腔内后，水解酶立即获得以正常方式加工的 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 寡糖链，一直达到高尔基体。在高尔基体内侧，通过添加一个或更多甘露糖 6-磷酸残基，以不同方式修饰那些来自分泌糖蛋白水解酶的寡糖。当溶酶体酶到达外侧高尔基体网络时，由甘露糖 6-磷受体结合甘露糖 6-磷酸残基（图 10.5）。受体和酶的复合体，经过披网格蛋白小泡，被输送到后期的内体，酶在内体的酸性条件下从受体中释放。而后，释放的酶进行包装，进入溶酶体，在溶酶体中去除磷酸标签，同时，受体循环返回外侧高尔基体网络，再行接送更多的酶。除此之外，甘露糖 6-磷酸受体还可以循环至质膜，再去俘获分泌途径逃脱的水解酶。

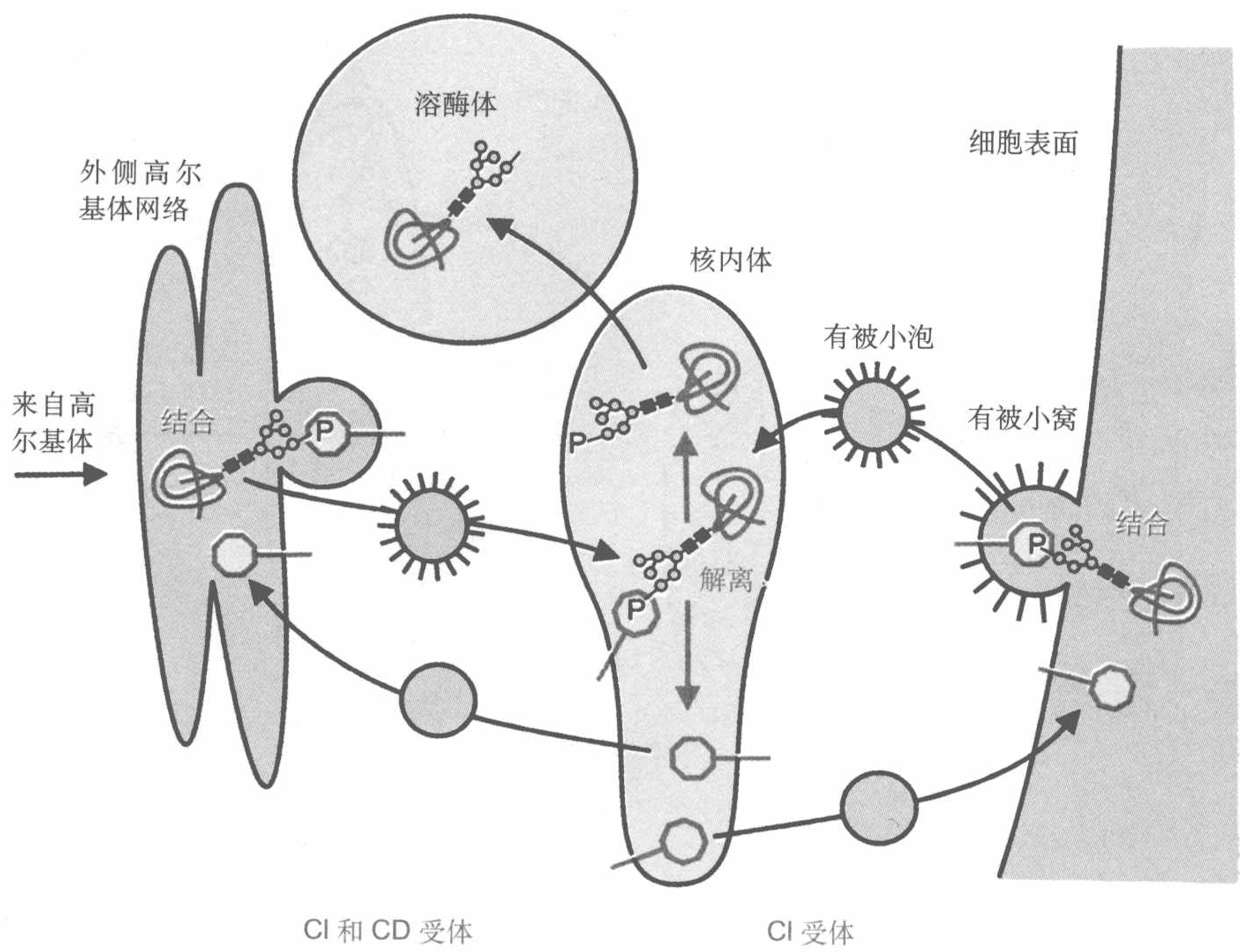


图 10.5　两甘露糖 6- 磷酸受体介导的糖蛋白运输路线。两种受体都可以介导从高尔基体外侧到内体分拣区室的运输，但只有阳离子依赖型受体介导从胞外介质的摄入

糖生物学与疾病 I- 细胞症

对一种 I- 细胞症（I-cell disease）——溶酶体贮积病（lysosomal storage disorder）患者的研究，可以深入了解甘露糖 6- 磷酸的识别系统。I- 细胞症患者的溶酶体，因缺失正常人溶酶体所有的水解酶，其中残留着大量未消化物。在患者的血液中出现高水平的溶酶体酶，表明这种酶未能有效地靶向溶酶体，而是大量地分泌流失。I- 细胞症患者新合成溶酶体水解酶的寡糖链不含甘露糖 6- 磷酸，是因为缺少形成这一修饰所需的两种酶中前一种酶（图 10.6）。需要这种磷酸基转移酶在甘露糖残基的 6- 羟基上添加 GlcNAc- 磷酸残基。然后，由磷酸二酯酶除去 GlcNAc 残基，留下甘露糖 6- 磷酸。因为只有预定前往溶酶体的酶，才标有甘露糖 6- 磷酸标签，这种磷酸基转移酶必须识别接纳体寡糖，也要识别结合的蛋白质。为防止分泌蛋白错误地靶向溶酶体，这种磷酸基转移酶对溶酶体酶具有高度的专一性。虽然溶酶体酶表面的赖氨酸残基需要被 GlcNAc- 磷酸基转移酶识别，但至今仍未确切了解这种专一性是如何获得的。

10.6 两类甘露糖 6- 磷酸受体参加溶酶体酶的靶向

结构不同的两种甘露糖 6- 磷酸受体以高亲和力与载有末端甘露糖 6- 磷酸残基的寡糖结合（图 10.6）。比较小的阳离子依赖型甘露糖 6- 磷酸受体（cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, CD-MPR）在 Ca^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下与甘露糖 6- 磷酸结合。较大型的阳离子非依赖型甘露糖 6- 磷酸受体（cation-independent mannose 6-phosphate receptor, CI-MPR）与配体结合不需要阳离子。这两种受体多数是在 pH 6~7 条件下结合配体，效果

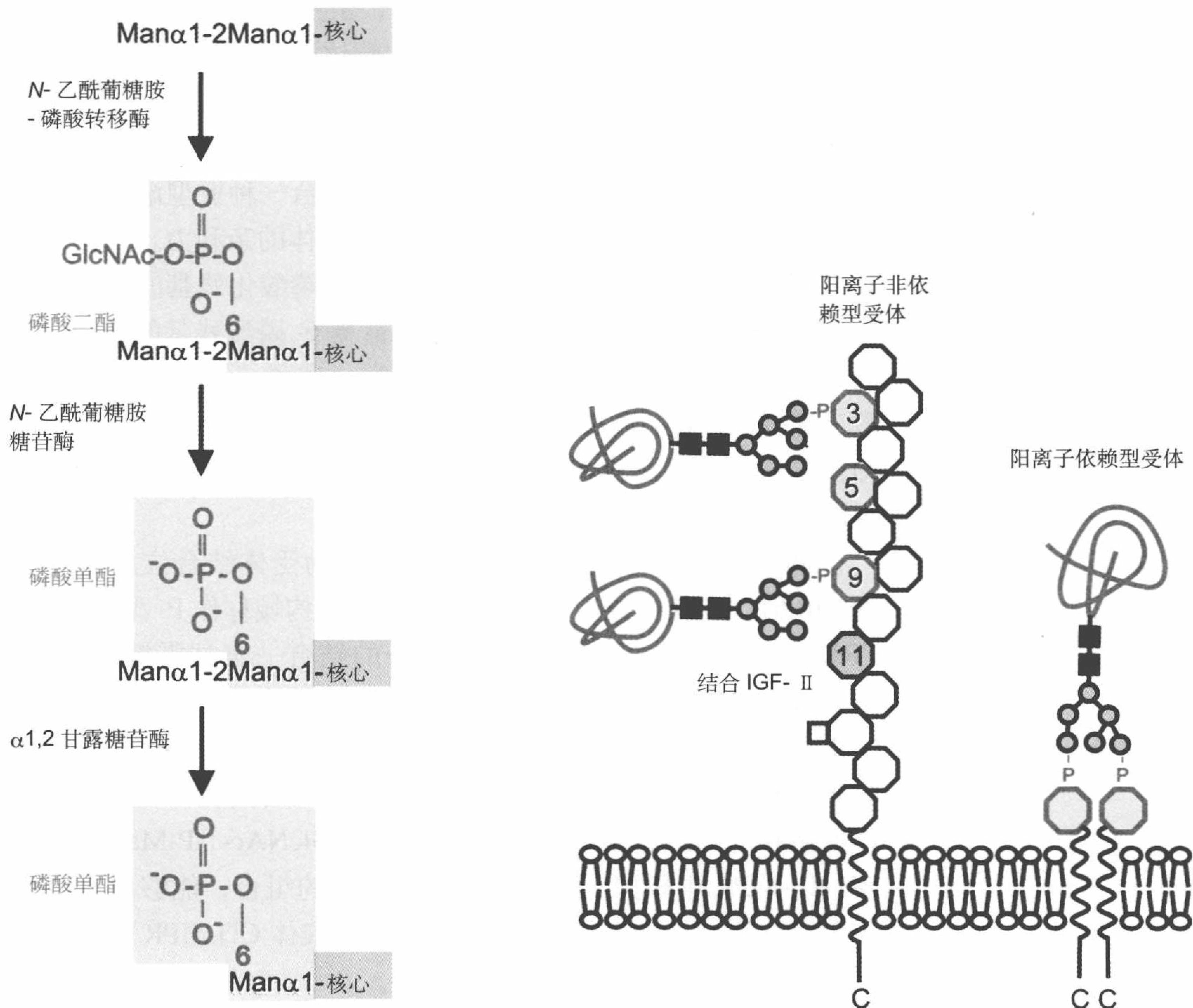


图 10.6 高甘露糖型 N- 连接聚糖末端甘露糖 6- 磷酸识别标志的生物合成和两种甘露糖磷酸受体的结构示意图。IGF- Ⅱ、胰岛素样生长因子 Ⅱ

最好， 使受体能在高尔基体外侧网络中与水解酶相互作用，受体还可以在酸性更高的内体环境中释放溶酶体酶。

基因敲除实验表明，对溶酶体酶的有效导向，需要这两种甘露糖 6-磷酸受体。缺失 CD-MPR 的突变小鼠，其血清中的磷酸化溶酶体水平提高，表明 CI-MPR 不能完全补偿 CD-MPR 的损失。缺失 CI-MPR 的成纤维细胞，其溶酶体酶的水平下降，溶酶体中积累的未消化物增加。缺失 CI-MPR 成纤维细胞中溶酶体的功能变化，比缺失 CD-MPR 的变化情况更为显著。通过对缺失 CI-MPR 小鼠的分析，由于这一受体也具有清除胰岛素样生长因子Ⅱ（insulin-like growth factor Ⅱ）的功能，而变得复杂化。胰岛素样生长因子Ⅱ与细胞表面的 CI-MPR 结合，虽然没有甘露糖 6- 磷酸参与，而且与受体的结合位点也不同于通常与溶酶体酶结合的位点，仍能导向溶酶体进行降解。

溶酶体酶有效导向需要两种类型甘露糖 6- 磷酸受体，可能因为这些受体具有不同的专一性，每一受体各自结合一种亚型溶酶体酶，但是，甘露糖 6- 磷酸残基的数目和位置可能改变受体的亲和力。例如，CD-MPR 与具有两个磷酸化残基的寡糖要比只有一个磷酸化残基的寡糖结合得更加紧密。而 CI-MPR 与具有一个或两个甘露糖 6- 磷酸残基的结合，其亲和力相同。CI-MPR 也可以与由磷酸基转移酶（磷酸二酯酶不起作用，因此，磷酸二酯得以保留）添加 GlcNAc-1- 磷酸修饰的聚糖结合，但 CD-MPR 不能。即使这些溶酶体酶逃避高尔基体内侧磷酸二酯酶的作用，CI-MPR 的活性也能够正确导向溶酶体酶。

两受体显示的亲和力差别可能是因为受体结合位点的排列有所不同(图 10.6)。受体中结合甘露糖 6- 磷酸的结构域称作 P- 型糖识别域（P-type CRD）。CD-MPR 的腔内区是由单一的结合一个甘露糖 6- 磷酸残基的 P-型 CRD 组成。但是，受体二聚化就可以结合两个甘露糖 6- 磷酸残基。CI-MPR 含有 15 个 P- 型 CRD 样结构域，但仅有 3 个这种结构域可以结合甘露糖 6- 磷酸。结构域 3 和 9 以高亲和力与甘露糖 6- 磷酸结合，结构域 5 以低亲和力结合甘露糖 6- 磷酸，但是与 GlcNAc-1-P-Man 磷酸二酯结合紧密。CI-MPR 中磷酸化糖的 3 个不同位点的组合，能够以高亲和力广泛地与磷酸化聚糖结合。因此，CI-MPR 和二聚体 CD-MPR 优先与具有不同数目单一或二磷酸化聚糖的水解酶结合。

在 P- 型糖识别域结合位点中，与甘露糖 6- 磷酸关键性的相互作用，采取了氢键与 2 位、3 位、4 位上特征性羟基的反应形式，作为甘露糖的选择性位点（图 10.7）。P- 型糖识别域保守的特征性精氨酸残基参与了这些氢键，不与带负电荷的磷酸取代基相互作用。与 C- 型糖识别域中的结

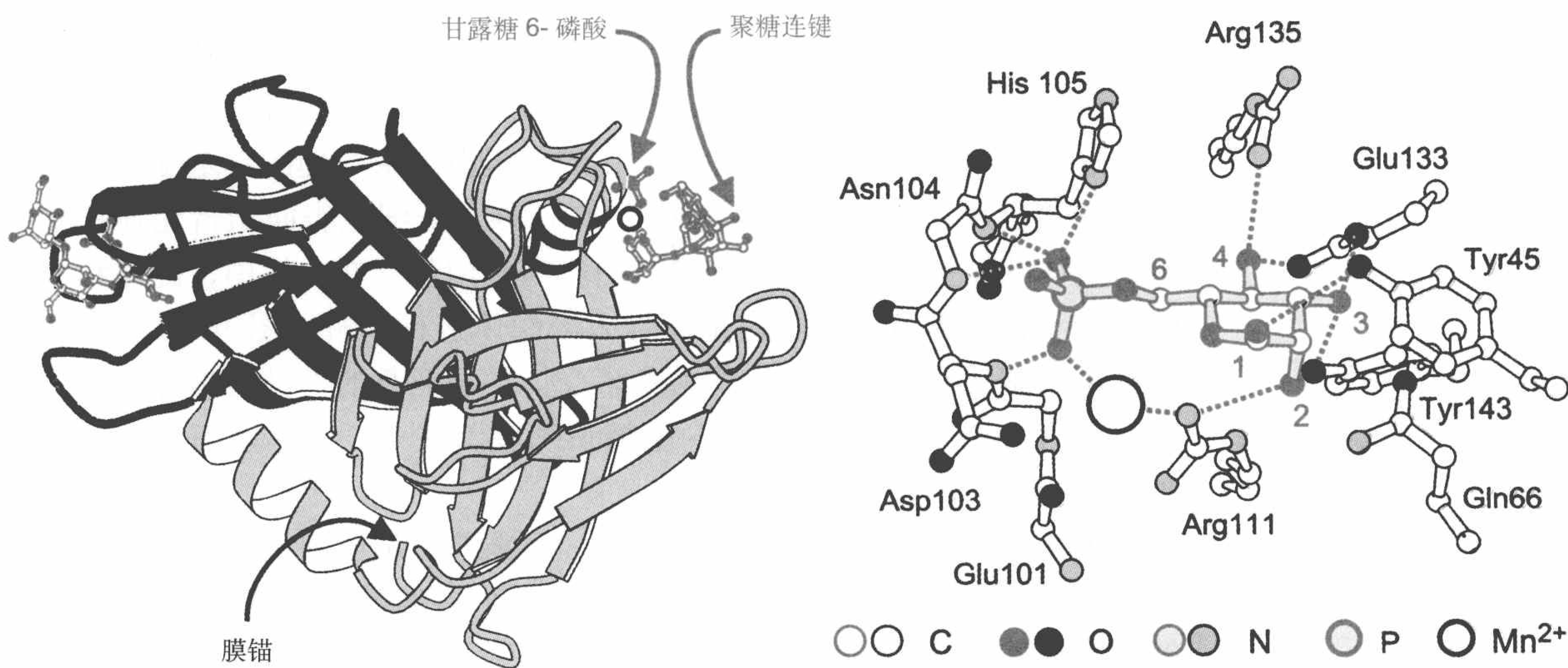


图 10.7 阳离子依赖型甘露糖 6- 磷酸糖识别域的整体折叠和单糖结合位点（根据蛋白质数据库 1C39 条目）

合位点一样，P- 型糖识别域的配体结合位点也涉及二价阳离子。但在这个例子中结合的 Mn^{2+} 是与配体的磷酸部分相互作用，而不是与糖上的羟基作用。余下的载有磷酸蛋白的多数相互作用都通过具有主链原子的氢键。

甘露糖 6- 磷酸受体识别分泌途径早期添加到所有糖蛋白上稍经修饰的寡糖。这种在分泌途径中修饰和随后识别高甘露糖型寡糖的能力是最近的进化期事件，因为以甘露糖 6- 磷酸受体作为胞内酶导向仅限于高等动物细胞。无脊椎动物没有这种功能性甘露糖 6- 磷酸受体。有关这方面，甘露糖 6- 磷酸导向系统与前面各节所述导向系统不同，在这一系统中，识别分泌途径早期添加到所有糖蛋白的糖，对所有真核细胞具有重要作用。

10.7 无唾液酸糖蛋白受体清除改变的血清糖蛋白至肝脏

凝集素除介导细胞区室间的运输外，也参与糖蛋白到细胞的运输。无唾液酸糖蛋白受体（asialoglycoprotein receptor）和甘露糖受体（mannose

receptor）都结合循环中的糖蛋白和介导两者的胞吞作用。无唾液酸糖蛋白受体结合含有末端半乳糖或 *N*- 乙酰半乳糖胺（GlaNAc）残基的聚糖。经唾液酸酶（神经氨酸酶）处理，清除血清糖蛋白末端唾液酸残基可以产生载有这类聚糖的糖蛋白。去唾液酸化的糖蛋白与未处理的完全唾液酸化的血清糖蛋白相比，其半衰期较短（图 10.8）。肝细胞表面结合无唾液酸糖蛋白受体的糖蛋白，通过披网格蛋白小窝被内化。在内体中，配体和受体的复合物尚未偶联，糖蛋白随即导入溶酶体进行降解（图 10.9）。无唾液酸糖蛋白是发现的第一个动物凝集素受体，是亚基的一种三聚体，每一受体，各含一个结合半乳糖的 C- 型糖识别域。这一三聚体以高亲和力与三天线 N- 连接聚糖结合。

有人提出，无唾液酸糖蛋白受体，可能具有清除血清糖蛋白的综合性作用。当糖蛋白进行循环时，从复合寡糖清除唾液酸残基的唾液酸酶，能够逐渐地发现末端的半乳糖残基。半乳糖残基一旦完全暴露，糖蛋白将与无唾液酸糖蛋白受体结合，并从循环中清除。这种反应机制表明血清糖蛋白的半衰期受控于其载有的复合寡糖数目，以及能接触到唾液酶的能力。在这种情况下，各受体能够控制多个不同的血清糖蛋白。但是，缺失功能性无唾液酸糖蛋白受体的小鼠，并不表现血清糖蛋白代谢缺陷，也没有出现内源性无唾液酸糖蛋白积聚，甚至也不能清除循环中注入的末端为半乳糖残基的糖蛋白。另外，至今还没有一种唾液酸酶可以从循环中清除糖蛋白的唾液酸。因此，可能是这种受体具有清除糖蛋白的特殊功能，能够清除血清非重要成分中载有末端半乳糖或 GalNAc 残基的糖蛋白，然而，据有这类末端糖的生理学配体还有待证实。

有人提出受体还具有调节血清糖蛋白水平的作用，这种血清糖蛋白含有末端唾液酸与 GalNAcβ1-4GlcNAc 或 Galβ1-4GlcNAc 连接 α2-6 的聚糖。在这些糖蛋白上的 GalNAc 或半乳糖残基，虽然具有加帽唾液酸，仍能合适地进入无唾液酸糖蛋白受体的结合位点，因为唾液酸的 α2-6 连键使 3 位和 4 位的羟基处于自由状态。因此，只有连接半乳糖或 GalNAcα2-6 连键的唾液酸化聚糖才需要无唾液酸化，使其能与受体结合。含有唾液酸与 GalNAcβ1-4GlcNAc 连接 α2-6 的聚糖并不多见。实际例子包括人妊娠特异性生殖糖蛋白和大鼠催乳素样激素。与其相比，在血液循环中具有唾液酸与 Galβ1-4GlcNAc 连接 α2-6 的寡糖的糖蛋白则非常普遍。由于血液中含有丰富的这些糖蛋白，很难证明末端为 NeuAcα2-6Gal 的蛋白质可以快速清除，因为肝脏上的无唾液酸糖蛋白受体与这些配体是处于正常的饱和状态。但是，一些常见的载有末端 NeuAcα2-6Gal 聚糖的血清糖蛋白水平，包括触珠蛋白和血清淀粉样蛋白的水平，在敲除小鼠无唾液酸糖蛋白受体

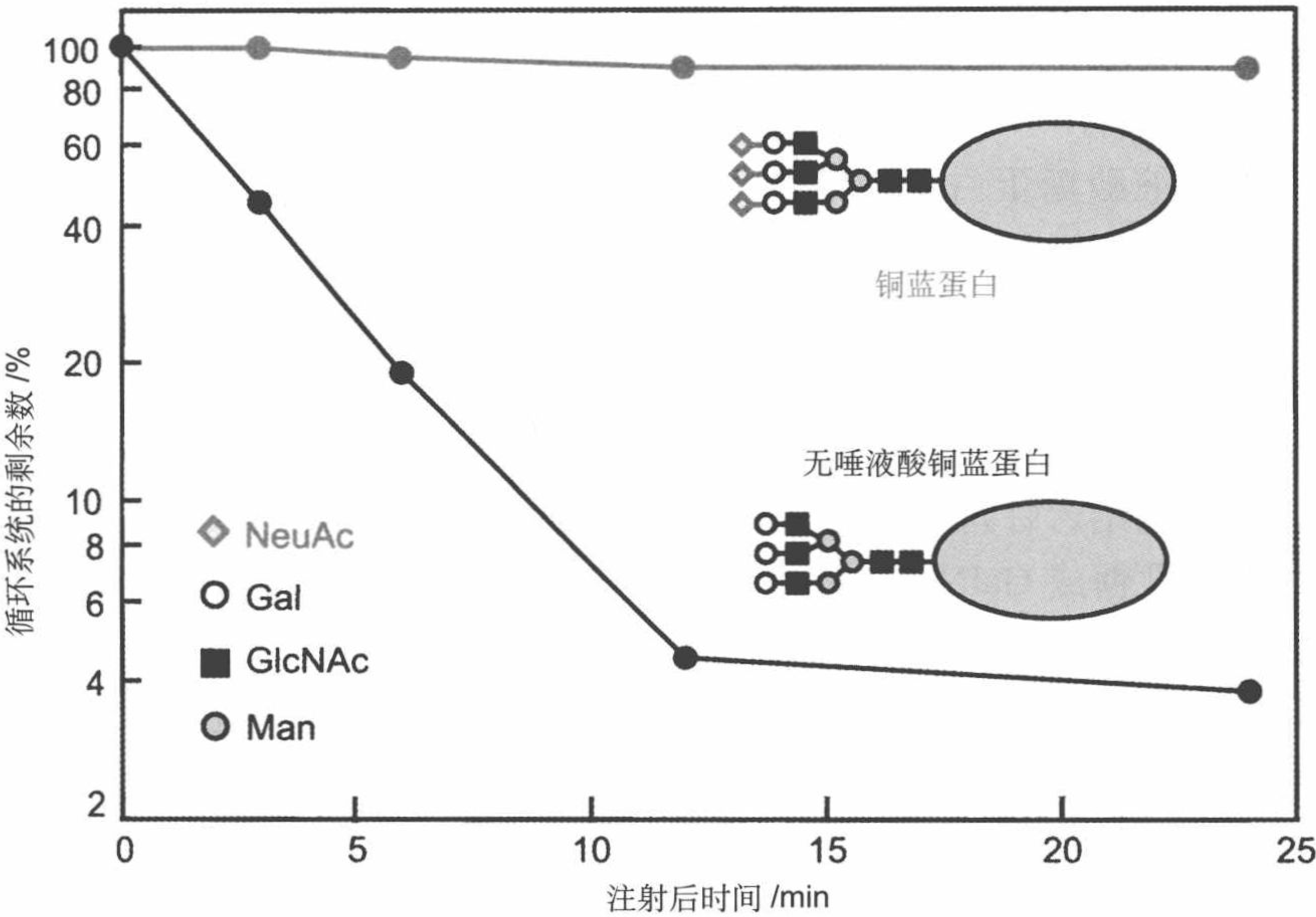


图 10.8 由肝脏无唾液酸糖蛋白受体介导，从循环系统清除无唾液酸糖蛋白的动力学。以唾液酸酶处理放射性标记的血清铜蓝蛋白（caeruloplasmin），可以快速地从循环系统清除（摘自 Morell, A.G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H., and Ashwell. G.（1968）Physical and chemical studies on ceruloplasmin:V. Metabolic studies on sialic-free ceruloplasmin in vivo. Journal of Biological Chemistry 243,155-159.）

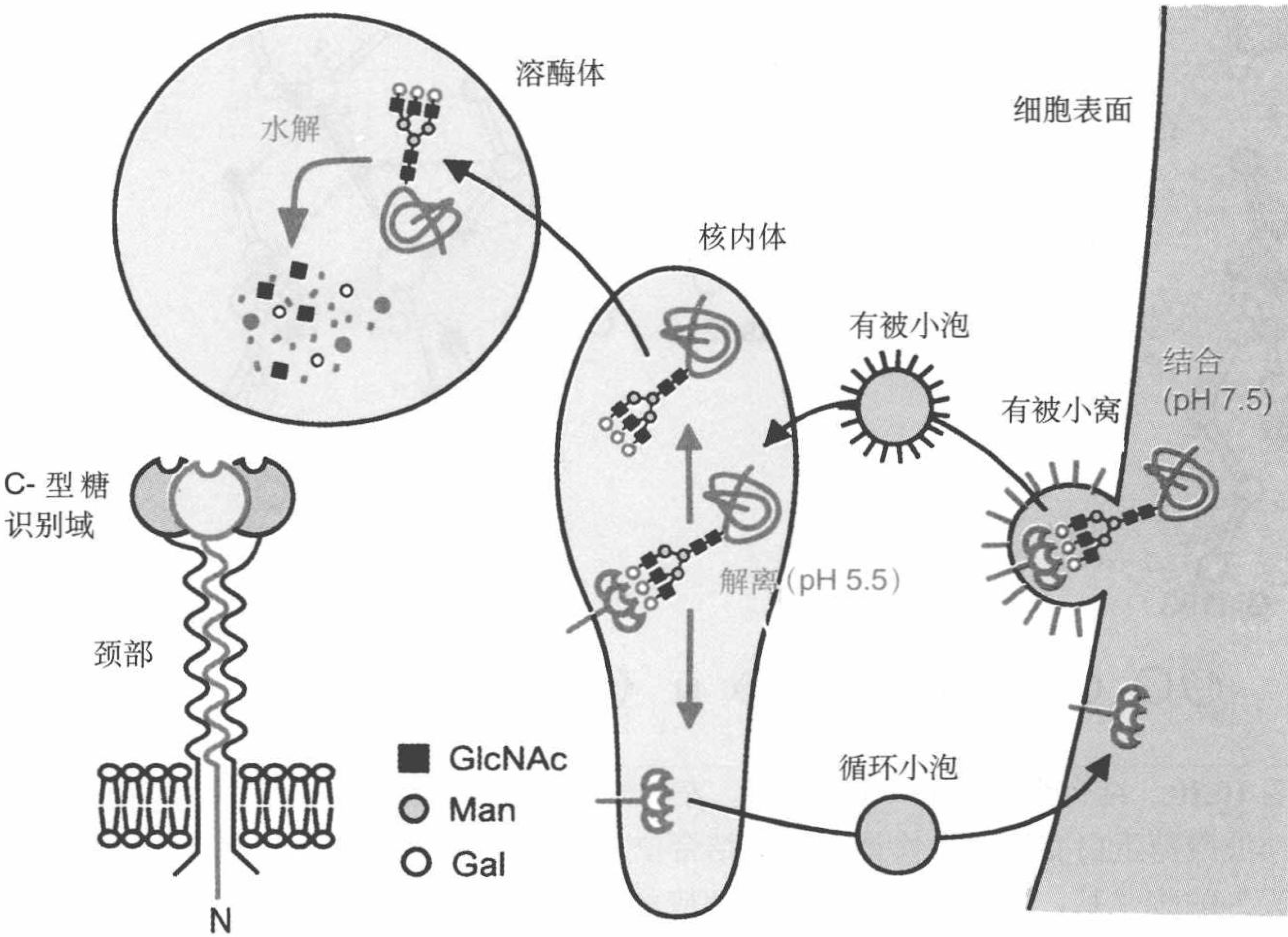


图 10.9 无唾液酸糖蛋白上，具有末端半乳糖残基无唾液酸糖蛋白受体的相互作用，无唾液酸的摄入和降解途径以及受体的循环。受体含有优先与 N- 连接聚糖不同分支结合的两亚型

的血清中都有所升高，为通过受体清除糖蛋白，可能促进调节蛋白质的周转提供了证明。

无唾液酸糖蛋白受体结合半乳糖的 C- 型糖识别域与 MBP 的糖识别域具有相同的折叠模式。第 9 章中讨论的 C- 型 CRD 与甘露糖和 GlcNAc 一类的己糖结合，而无唾液酸糖蛋白受体则与半乳糖相关的己糖结合。这两组已糖的区别在于 4- 羟基的定向。对结合甘露糖和结合半乳糖 CRD 的序列进行对比，显示出结合位点中 Ca^{2+} 连接残基的一个重要区别（图 10.10）。当结合甘露糖型糖时，3- 羟基将旋转为不利的构象。与此相反，在结合半乳糖或 GalNAc 时，3 位和 4 位的羟基可处于合适的位置。无唾液酸糖蛋白受体取代甘露糖结合蛋白，导致结合甘露糖的专一性改变为半乳糖的专一性。在甘露糖结合蛋白修饰的糖识别域中，邻近半乳糖结合位点处，掺入色氨酸残基，将使结合半乳糖的亲和力高于结合无唾液酸糖蛋白受体的亲和力，因为在色氨酸芳香环和半乳糖非极性 B 面之间形成了疏水包装相互作用。半乳糖的选择性超过甘露糖，需在无唾液酸糖蛋白受体插入一富含甘氨酸的环，防止色氨酸侧链移动。当侧链位置固定，就可以防止甘露糖结合，如果缺失富含甘氨酸的环，吲哚环移动出环外，并使甘露糖进入结合位点。半乳糖的特异性超过甘露糖由于两影响因素：营造有

➲有关糖残基极性参见 7.2 节。

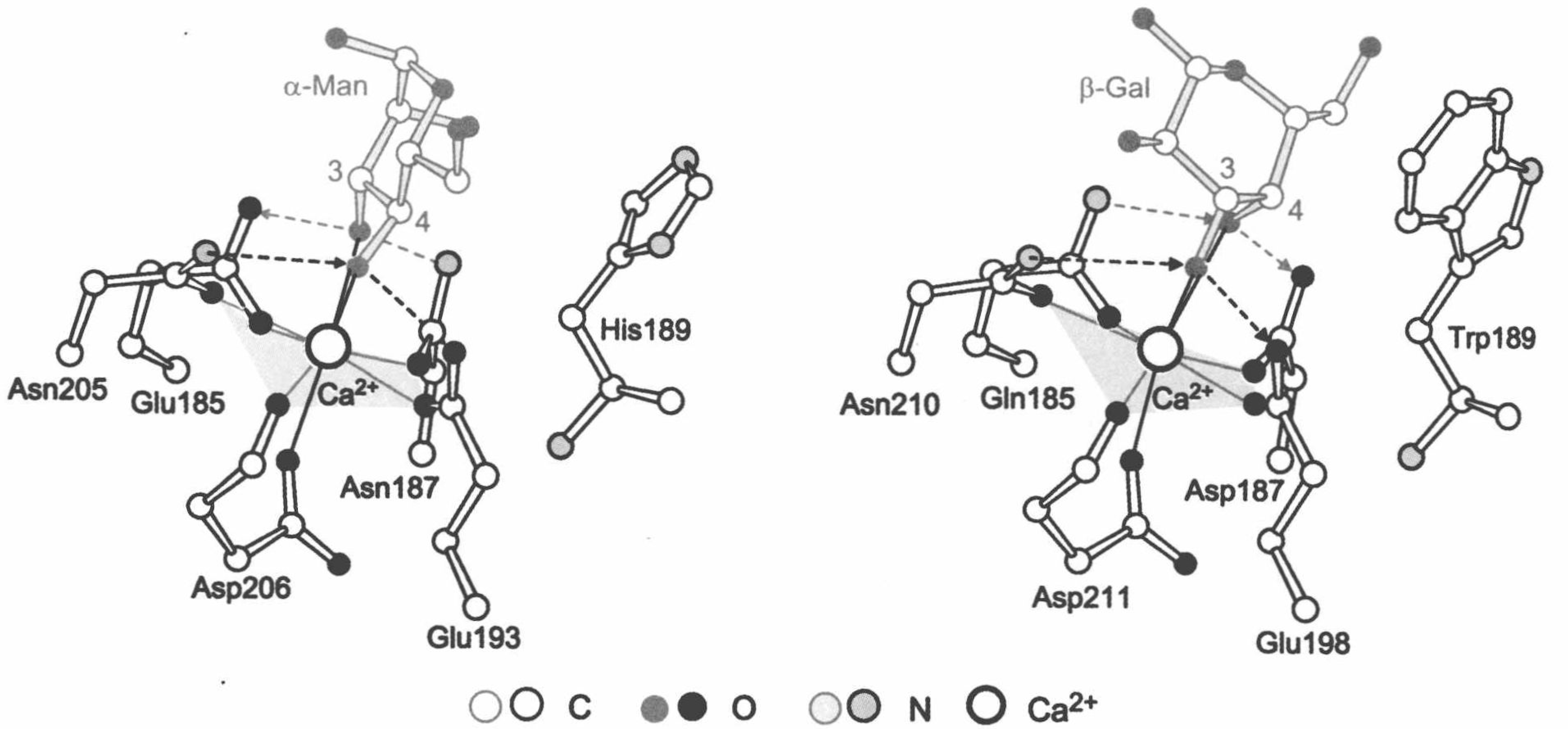


图 10.10 结合半乳糖的 MBP 修饰。左图表示 MBP 天然的结合位点，右图表示模拟无唾液酸糖蛋白受体介入修饰形成的结合位点。与甘露糖 3- 羟基相互作用的是谷氨酸和天冬酰胺残基；半乳糖结合位点中相应的残基为谷氨酸胺和天冬氨酸（根据蛋白质数据库 2MSB 和 1AFA 条目）

框 10.1 疾病糖生物学：*无唾液酸蛋白受体预防脓毒病*

能在循环糖蛋白聚糖上去唾液酸并对无唾液酸糖蛋白产生配体的内源唾液酸酶尚未得到证实。但是许多细菌病原体表达唾液酸酶，因此可能在细菌感染过程中产生受体的去唾液酸的配体。在感染肺炎链球菌小鼠的研究中，用作人血液中毒导致严重细菌感染（脓毒病）的模型，表明血小板上的糖蛋白通过神经氨酸酶 A 细胞酶的作用变成去唾液酸的糖蛋白。感染的小鼠由于无唾液酸糖蛋白受体对去唾液酸血小板的清除，出现血液中血小板减少（血小板减少症）。在无唾液酸糖蛋白受体缺乏、感染肺炎链球菌小鼠的血小板去唾液酸的程度与野生型感染小鼠相同，但血小板未从血液中清除，因此血小板仍保持正常水平。缺乏无唾液酸糖蛋白受体在感染后，要比野生型感染小鼠早些死亡，表明缺乏无唾液酸糖蛋白受体，对血凝系统具有严重影响，包括在肾脏和肝脏血管中形成的血块增加，和出现脾脏出血。

这些发现在临床上非常重要，因为感染肺炎链球菌或其他细菌的脓毒病患者，多发展为威胁生命的弥散性血管内凝血（dissiminated intravascular coagulation，DIC）。DIC 症状表现为微血管中出现超常的血块，和因血凝系统被破坏，出现严重的出血。对患有脓毒病小鼠的研究，发现无唾液酸糖蛋白受体缺陷小鼠表现 DIC 样超常血凝块和出血症更加明显，表明通过无唾液酸糖蛋白受体清除去唾液酸的血小板可能延缓导致死亡的严重血凝缺陷。降低现有血小板的数目可能放慢血凝和防止导致超常出血的血凝因子的耗量。感染小鼠的血小板数目下降还有可能挽救，但人患者的情况可能更为复杂。脓血病患者血小板水平的下降与高死亡率相关。另外，DIC 也可能在不表达唾液酸酶细菌引发的脓血病中发生。因此，在这种情况下不会发生由无唾液酸糖蛋白受体清除血小板。但是，这些实验突出地表明，虽然无唾液酸糖蛋白受体的去唾液酸配体不会在正常生理条件下出现，但可以在病理条件下产生。

论述题

- 论述无唾液酸糖蛋白受体有助于止血控制。

主要文献

- Ellies, L.G., Ditto, D., Levy, G.G., Wahrenbrock, M, Ginsburg, D., Varki, A., Le, D.T., and Marth, J.D. (2002). Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **99**, 10042-10047.
- Grewal, P.K., Uchiyama, S., Ditto, D., Varki, N., Dzung, D.T., Nizet, V., and Marth, J.D. (2008). The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis, *Nature Medicine* **14**, 648-655.
- Rumjantseva, V., Grewal, P.K., Wandall, H.H., Joseffson, E.C., Sorensen, A.L., Larson, G., Marth, J.D., Hartwig, J.H., and Hoffmeister, K.M. (2009). Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets, *Nature Medicine* **15**, 1273-1280.

利的氢键和疏水性相互作用容纳半乳糖配体，和创建空间冲突排斥甘露糖。这些结果说明，由于结构域表面 C- 型糖识别域中结合位点的凹口浅狭，和不同类型糖的特异性是根据蛋白质和糖配体少数接触产生的，因此，氨基酸数目只要稍微改变，糖的选择性就会改变。

基于半乳糖 3 位和 4 位羟基的配置，与甘露糖结合方式相比，结合位点中的半乳糖环约转动 90°。由于这一重新定向，使半乳糖 2- 位比甘露糖的 2- 位更靠近蛋白质表面。GalNAc 延伸的 2- 取代基能与 CRD 表面相互作用，可以使无唾液酸糖蛋白受体比半乳糖更优先地与 GalNAc 结合。

10.8 甘露糖受体可从循环系统清除天然的糖蛋白

从应答病理学事件细胞释放的胞内糖蛋白，展示甘露糖受体识别的高甘露糖型寡糖（图 10.11）。当发生炎症、感染和组织损伤时，这些糖蛋白，包括溶酶体酶、组织纤溶酶原激活物和中性白细胞髓过氧化物酶，分别分泌和流入血液或血管外部空间。释放的溶酶体酶和髓过氧化物酶，对攻击入侵的病原体具有重要作用，而组织纤溶酶原激活物则启动血块的溶解过程。由于这些酶具有潜在的有害活性，必须严格调控它们在循环系统中存在的限度，以免造成损伤。通过肝脏中或巨噬细胞上甘露糖受体对这些蛋白质上高甘露糖型寡糖的识别，导致它们的内化和降解。甘露糖受体是清除溶酶体酶和髓过氧化物酶的主要机构，但是肝细胞上低密度脂蛋白受体相关的蛋白质也可以清除组织纤溶酶原激活物。

➲有关组织纤溶酶原激活物参见 8.7 节。

敲除甘露糖受体基因的小鼠，不能把末端甘露糖的糖蛋白清除到肝脏，而且循环系统中有些溶酶体酶的水平升高。甘露糖受体，除在炎症应答产物清除上起作用外，还可以与 I- 型前胶原前肽结合。这种载有单一高甘露糖型寡糖的肽，是在组织造型和创伤愈合中，胶原原纤维形成过程中从前胶原裂解形成的。在敲除小鼠甘露糖受体中，循环胶原前肽的水平也有提高。

10.9 甘露糖受体调控硫酸化激素的活性

垂体激素促黄体素的浓度急增可以触发排卵，在循环中这种激素的偶

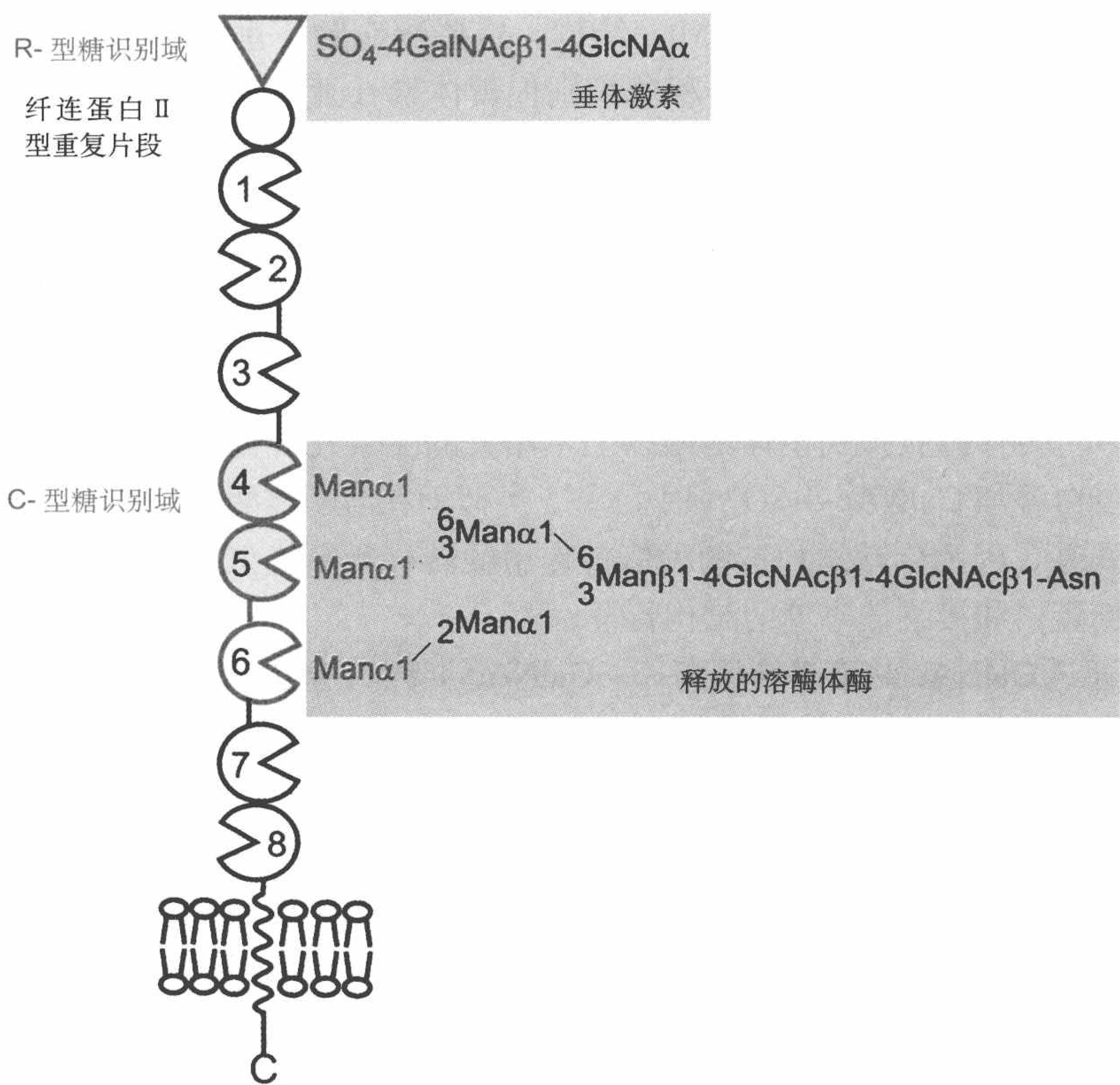


图 10.11 甘露糖受体的整体组织，突出地显示含有高甘露糖型寡糖和硫酸化配体与各类蛋白质模块相互作用的延伸结构

然性水平起伏对其靶细胞上受体的有效激活非常重要。这种上升和下降是通过曾在靶细胞上起作用，迅速从循环系统清除之后，垂体促黄体激素的调控释放作用实现的。促黄体素载有异常的复合寡糖，其末端为 4-O- 硫酸化 GalNAc 残基（图 10.12）。在肝脏中通过甘露糖受体识别这种 GalNAc-4-SO_4 残基，导致促黄体素从循环中迅速清除。硫酸化 GalNAc 残基与甘露糖受体 N 端结构域结合（图 10.11）。这一结构域是植物凝集素蓖麻毒蛋白的同系物，被称为 R- 型 CRD（R-type CRD）。由此，甘露糖受体是凝集素中的异种，其中含有两种被不同机构识别糖的不同类型的糖识别域。

➲有关垂体激素参见 8.6 节。

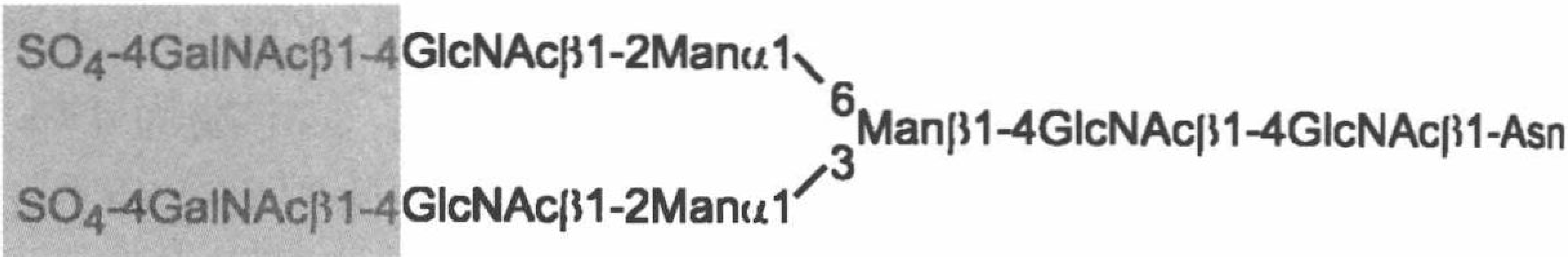
➲有关 R- 型糖识别域参见 11.5 节。

在妇女月经周期最初阶段刺激子宫内膜发育的，促黄体素和促滤泡素，两种垂体激素具有相同的 α 亚基，这两种激素还具有同源 β 亚基。生物合成过程中，由蛋白质特异性 GalNAc 转移酶，将 GalNAc 添加到促黄体素聚糖，由 GalNAc-4- 磺基转移酶——GalNAc-4-ST1，将磺基添加到产

生的 GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-2Man 结构。这些酶在脑下垂体中高度表达。这种蛋白质专一性 GalNAc 转移酶识别促黄体素 α 亚基中簇聚的碱性氨基酸残基。这种酶识别序列也出现在促滤泡素相同的 α 亚基，但这一激素中的序列不容易接近这种酶。因此，须在促滤泡素的聚糖上添加半乳糖和唾液酸残基形成标准的二天线复合寡糖（图 10.12）。循环中的这一激素具有半衰期增长的效果。GalNAc 4-SO_4 修饰作用也出现在另一促甲状腺激素上，其结构与垂体中产生的糖蛋白激素相关，除此之外，也出现在含有 GalNAc- 转移酶肽识别模体的结构上不相关的少数几种糖蛋白上。对选定的糖蛋白添加 GalNAc-4-SO_4 识别标签，类似于在溶酶体酶上添加甘露糖 6-磷酸残基，因为启动添加这两种修饰作用的转移酶须能识别添加特异标签的各糖蛋白和接纳体寡糖的结构特征。

通过 GalNAc 4- 磺基转移酶——GalNAc-4-ST1，基因敲除小鼠的表型，突出地表明促黄体素寡糖上特异性 GalNAc 4-SO_4 识别标签对生理学功能的重要性。缺失这种基因的雌性小鼠比野生型小鼠可以更早地达到性成熟，具有较长的发情期，能生产多胎。不存在磺基转移酶的情况下，促黄体素寡糖上添加 GalNAc 残基，但这些残基未经磺化，因此不能被甘露糖受体的 R-型糖识别域识别。结果循环系统中的促黄体素半衰期增加，产生更多的雌激素刺激。有趣的是敲除小鼠中，好像多数促黄体素的寡糖都是唾液酸化的，其唾液酸与 GalNAcα2-6 连键连接。载有末端 NeuAcα2-6GalNAc 寡糖的促黄体素可以结合无唾液酸糖蛋白受体，结果发现，虽然敲除小鼠中促黄体素的半衰期比较长，如果它只经过肾脏过滤，仍然会迅速地从循环中清除。

促黄体素 = 促黄体激素（LH）



促滤泡素 = 促滤泡激素（FSH）

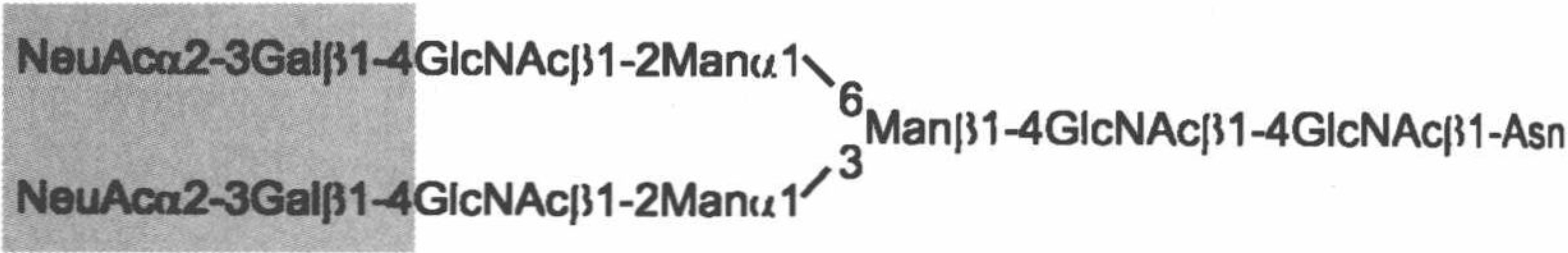


图 10.12　结合垂体糖蛋白激素的 N- 连接聚糖。迅速从循环中清除的激素都加帽 GalNAc-4-SO_4 残基，不是长寿命典型血清糖蛋白的末端唾液酸残基

框 10.2 糖治疗药物：*重组糖蛋白的糖基化*

利用 DNA 重组技术可以生产出从天然资源难以纯化的足够数量的人蛋白质，并使其在实际治疗中应用。例如，现在就是通过在大肠杆菌中表达生产治疗糖尿病的重组人胰岛素。

在实验研究中，通常选用细菌或酵母作为表达蛋白质的宿主，因为它们能够迅速地生产大量价格低廉的蛋白质。但是作为治疗药物的重组人蛋白质在糖基化反应上有特殊要求，需要保证正确的翻译后修饰，一般情况下必须在哺乳动物细胞中生产（参见第 13 章）。重组蛋白质的糖基化必须严格控制，因为不正确的糖基化对循环蛋白质的半衰期有很大影响，甚至直接影响蛋白质的活性。

红细胞生成素（Erythropoietin, EPO），这种酸性糖蛋白激素，是以重组方式成功地生产药物激素的典范。从肾脏释放到血液中的红细胞生成素，能够刺激骨髓前体细胞中红细胞的生长和成熟。阿法怡泼定（Epoetin alfa）是一种在中国仓鼠卵巢（CHO）细胞中生产的重组形式的红细胞生成素，从 1988 年开始已在临床上用于治疗贫血症，主要治疗因天然红细胞生成素生成减少，和癌症化疗副作用引起的肾衰性贫血。红细胞生成素含有 3 个 N- 连接糖基化位点和一个 O- 连接糖基化位点。对从人尿中分离的和以重组形式制备的红细胞生成素进行比较，表明在 CHO 细胞中能够生产正确糖基化的这种糖蛋白。在天然和重组形式红细胞生成素中的全部 3 个 N- 连接糖基化位点多被唾液酸化复合四天线寡糖占据。天然和重组形式的两种红细胞生成素的主要区别在于天然的红细胞生成素含有 α2-3 和 α2-6 连接的唾液酸，而重组形式的红细胞生成素上，CHO 细胞不表达唾液酸化 α2-6 转移酶，只含 α2-3 连接的唾液酸。

不同的唾液酸连键不会影响红细胞生成素的活性，但寡糖的唾液酸化程度能够影响红细胞生成素在循环系统中的存活。用唾液酸酶可以处理并清除唾液酸的红细胞生成素的体内活性，因为唾液酸可通过无唾液酸受体从循环中快速清除，从而使之大幅度降低。移走或引进糖基化位点的诱变实验表明，即使未用唾液酸酶处理，红细胞生成素在循环中的存活与多肽寡糖的数目密切相关，糖基化程度越高，寿命越长。这种糖基化的效果，已在重组形式长寿红细胞生成素的生产中应用。作为位点定向诱变的结果，红细胞生成素多肽链中引入另外两个 Asn-Xaa-Thr 序列，阿法达贝泊汀（Darbepoetin alfa）因位点定向诱变，在红细胞多肽中增加引进两个 Asn-X-Thr 序列，具有 5 个 N- 连接寡糖。额外增加两个寡糖对红细胞生成素的结构和活性没有影响，但是这一重组形式的生成素在循环中的存活期比具有 3 个 N- 连接寡糖的寿命长 3 倍。已经证实，Darbepoetin alfa 和 Epoetin alfa 在治疗贫血方面同样安全有效。由于 Darbepoetin alfa 在体内的活性有效期较长，用药次数少于 Epoetin alfa，意味着对患者的注射次数比较少。

重组红细胞生成素除在临床上用于治疗贫血外，有时也被有些运动员滥用。刺激红细胞的生成对运动员，例如，对自行车运动员增强耐力有利，因为红细胞产生的越多，输送到肌肉中的氧量越多。体育运动禁用红细胞生成素，为检测兴奋剂，在研发辨别人尿中天然和重组形式红细胞生成素上付出了很大努力。在这方面，

Epoetin alfa 与天然红细胞生成素的非常相似性成为检测的难点，但是采用等电聚焦或二维凝胶电泳联合免疫印迹技术能够辨别出两种形式的红细胞生成素在糖基化上的微小区别。

论述题

• 当研发这类医用形式的蛋白质时，为什么注意分析重组糖蛋白的糖基化作用，试论其重要性。

主要文献

• Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., Rogers, G., Rogers, N., Trail, G., and Egrie, J. (2003). Enhancement of therapeutic protein activities through glycoengineering, *Nature Biotechnology* **21**, 414-421.

• Elliott, S., Egrie, J., Browne, J., Lorenzini, T. Busse, L., Rogers, N., and Ponting, I. (2004). Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate, *Experimental Hematology* **32**, 1146-1155.

• Takeuchi, M., Takassaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N., and Kobata, A. (1988). comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells, *Journal of Biological Chemistry* **263**, 3657-3663.

10.10 有些胞内凝集素在细胞核内起作用

至少有两个半乳凝素，半乳凝素 1 和 3 输送到细胞核内。半乳凝素 3 在细胞质和细胞核之间的分布根据细胞的增殖状况有所不同。人和小鼠的半乳凝素 3 在细胞分裂时主要出现在细胞核内，但在休眠细胞中主要分布于细胞质。半乳凝素 1 和 3 两者与前信使 RNA 剪接机器的成分共同定位于细胞核内，而半乳凝素 3 出现在含有核糖核蛋白的高分子质量复合体。

利用体外剪接分析，对这两种在 RNA 剪接中蛋白质的作用提供了很好的生化证明。例如，以亲和层析法清除半乳凝素 1 或 3 的肿瘤细胞核提取液，出现剪接活性缺陷，这种活性可以通过添加重组半乳凝素 1 或重组半乳凝素 3 重新建构。但是缺失半乳凝素之一或缺失这两种半乳凝素的敲除小鼠还可以存活，表明这两种蛋白质在剪接中的作用并不是必要的。而且半乳凝素参与剪接过程，不可能涉及糖识别。虽然多数细胞核蛋白质都是添加 O- 连接 GlcNAc 进行修饰（参见第 3 章），但这种糖并不是半乳凝素的配体，而且半乳糖残基也未在胞质和细胞核蛋白质上出现。另外，糖

配体虽然可以抑制半乳凝素 1 和 3 在体外实验的剪接活性，半乳凝素 1 糖识别域中关键的天冬酰胺残基突变可以消除糖结合，但对剪接活性没有影响。 因此，可能是半乳凝素糖识别域介导了参与剪接的非凝集素的蛋白质与蛋白质的相互作用。

小　结

本章前半部分讨论的胞内识别事件涉及所有 N- 连接糖基化蛋白质共有的聚糖。在细胞表面行使各种功能的许多糖蛋白上加上了这类聚糖的标签。无唾液酸糖蛋白和甘露糖受体的清除系统，只要载有正确合适的聚糖，同样能够处理各种不同的糖蛋白。但是，讨论的甘露糖 6- 磷酸受体和与甘露糖结合的含有 4-*O*- 硫酸化 GalNAc 残基聚糖的这两个系统，都涉及与糖蛋白连接的特异亚类异常聚糖。这些特殊的聚糖能以糖蛋白体积不同的方式靶向选定的糖蛋白。特殊聚糖与目标糖蛋白的结合受控于糖蛋白氨基酸序列的信息。因为氨基酸序列在基因中编码，这样的配置安排，提供了一种能够在基因中编码靶向信息的机制。

主要参考文献

Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., and Molinari, M. (2009). N-glycan structures：recognition and processing in the ER, *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 74-82. 这篇论文和由 Lederkremer(2009)(见下) 发表的论文，都是对目前在糖蛋白折叠、质量管理和运输方面识别聚糖和蛋白质作用的理解作出的评论性文章。

Dagher, S. F., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing, *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **92**,1213-1217. 这篇论文和由 Voss 等 (2008)(见下) 发表的论文为半乳凝素参与 RNA 的剪接提供了证据。

Fiete, D. J., Beranek, M. C., and Baenziger, J. U. (1998). A cysteine-rich domain of the ‘man-nose’ receptor mediates GalNAc-4-SO_4 binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **95**,2089-2093. 说明了糖蛋白激素上结合硫酸化糖甘露糖受体 R- 型糖识别域的实验。

Kamiya,Y., Kamiya, D., Yamamoto, K., Nyfeter, B., Houri, H. -P, and Kato, K. (2008). Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53,VIPL,and VIP36,*Journal of Biological Chemistry* **283**,1857-1861. 界定三种 L- 型凝集素确切聚糖结合专一性的实验。

Kato, K. and Kamiya,Y. (2007). Structural views of glycoprotein-fate determination in cells, *Giycobiology* **17**,1031-1044. 参与糖蛋白折叠、质量控制和运输的酶和凝集素作用结构和机制的评论文章。

Kim, J. -J. P., Otson, L. J., and Dahms, N. M. (2009). Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors,*Current Opinion in Structural Biology* **19**,534-542. 详细评论了甘露糖 6- 磷酸受体的结构和功能。

Kotatkar, A. R., Leung,A. K., Isecke, R., Brossmer, R., Drickamer, K., and Weis,W. I. (1998). Mechanism of N-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate recognition domain,*Journal of Biological Chemistry* **273**,19502-19508. GalNAc 和半乳糖像无唾液酸糖蛋白一样与 C- 型糖识别域结合的结构基础。

Lederkremer, G. Z. (2009). Glycoprotein folding,quality control and ER-associated degradation,*Current Opinion in Structural Biology* **19**,515-523. 参见 Aebi 等 (2009)(见上) 发表的论文。

Lee, S. J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A. F., Risteli, J., Risteli, L., Lee,Y.C., Feizi, T., Langen, H., and Nussenzweig, M. C. (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum gtycoprotein homeostasis,*Science* **295**,1898-1901. 论文介绍了甘露糖受体敲除小鼠的分析，为受体对糖蛋白清除的作用提供了证据。

Mi, Y., Fiete, D., and Baenziger, J. U. (2008). Ablation of GatNAc-4-sulfotransferose-1 enhances reproduction by altering the carbohydrate structures of luteinizing hormone in mice, *Journal of Clinical investigation* **118**, 1815-1824. 论文对负责促黄体素 GalNAc 残基磺化反应的酶的缺陷小鼠表型进行了分析。

Mikami, K., Yamaguchi, D., Tateno, H., Hu, D., Qin, S.-Y., Kawasaki, N., Hiarbayashi, J., ito, Y., and Yamamoto, K. (2010). The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation, *Glycobiology* **20**, 310-321. 界定高甘露糖寡糖 OS-9 的专一性实验，并为 OS-9 在 ERAD 中的作用提供了证明。

Robe, S, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M., and Kim, J. -J. P. (1998). Molecular basis of lysosomal enzyme recognition：three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, *Cell* **93**, 639-648. 说明了 P 型 CRD 的晶体结构。

Schrag, J. D., Bergeron, J. J. M., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y., and Cygler, M. (2001). The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding, *Molecular Cell* **8**, 633-644. 描述钙连蛋白的晶体结构，增加对寡糖结合机制深入的了解。

Steirer, L. M., Park, E. I., Townsend, R. R., and Baenziger, J. U. (2009). The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid a2, 6-galactose, *Joumal of Biological Chemitry* **284**, 3777-3783. 说明了某些唾液酸化糖蛋白可以作为无唾液酸糖蛋白受体的实验。

Tozawa, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamamoto, K., Yagyu, H., Ohashi, K., Tamura, Y.,

Yahagi, N., lizuka, Y., Okazaki, H., Harada, K., Gotoda, T, Shimano, H., Kimura, S., Nagai, R., and Yamada, N. (2001). Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit: its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12624-12628. 无唾液酸糖蛋白敲除小鼠中清除糖蛋白的分析。

Voss, P.G., Gray, R. M., Dickey, S. W., Wang, W., Park, J.W., Kasai, K., Hirabayashi, J., Patterson, R. J., and Wang, J. L. (2008). Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **478**, 18-25. 参见 Dagher 等 (1995)(见上) 的论文。

习　题

10.1 用葡糖苷酶 1 抑制剂卡斯塔碱（Castanospermine）或 ER 甘露糖苷酶抑制剂（Kifunensine）处理糖蛋白合成和分泌的细胞系，预计会产生什么影响?

10.2 采用寡糖，而不用氨基酸序列作为糖蛋白在折叠、运输和清除方面的识别标志，其优点何在?

10.3 论述凝集素分泌途径中的功能。

10.4 描述在鉴定阳离子依赖型甘露糖 6- 磷酸受体中，多个甘露糖 6- 磷酸结合位点的不同性质?

参考文献：Bohnsack, R.N., Song, X., Olson, L.J., Kudo, M., Gotschall, R.R., Canfield, W.M., Cummings, R.D., Smith, D.F., and Dahms, N.M. (2009). Cation-independent man-nose 6-phosphate receptor. A composite of distinct phosphomannosyl binding sites, *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35215-35226.

Hancock, M.K., Yammani, R.D., and Dahms, N.M. (2002). Localization of the carbohydrate recognition sites of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to domains 3 and 9 of the extracytoplasmic region, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 47205-47212.

Hancock, M.K., Haskins, D.J., Sun, G., and Dahms, N.M. (2002). Identification of residues essential for cerbohydrate recognition by the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11255-11264.

Westlund, B., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (1991). The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7-11 of the extracytoplasmic region, *Journal of Biological Chemistry* **266**, 23233-23239.

10.5 某些糖蛋白输出内质网外，需要 ERGIC-53 的存在，讨论这方面的实验和医学证明。

参考文献: Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H.-P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins, *Nature cell Biology* **1**, 330-334.

Moussali, M., Pipe, S.W., Hauri, H.P., Nichols, W.C., Ginsburg, D., and Kaufman, R. J. (1999). Mannose-dependent ERGIC-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 32539-32542.

Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivelin, A., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Moussali, M.J., Hauri, H.-P., Ciavarella, N., Kaufman, R.J., and Ginsburg, D. (1998). Mutations in the gene for ERGIC-53, a protein of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII, *Cell* **93**, 61-70.

10.6 讨论以下议题；如何用敲除小鼠实验提供强有力的证明，证实甘露糖受体从循环中清除末端甘露糖的糖蛋白，而质疑无唾液酸糖蛋白受体在清除无唾液酸糖蛋白的作用。

参考 Lee 等 (2000) 和 Tozawa 等 (2001) 在本章主要参考文献中的论文。

植物、细菌和病毒糖生物学

11

学习目的
学习本章后，应知内容

1. 聚糖衍生物用作植物的信号传送分子
2. 植物和细菌毒素的作用机制
3. 细菌和病毒利用细胞表面聚糖作为受体

虽然本书以哺乳动物糖生物学作为重点，但在这一章里考虑的是令人感兴趣的植物和微生物糖生物学。比较糖生物学对聚糖的进化及其功能提供了有用的信息。本章的最后部分将讨论聚糖和凝集素的功能如何经过进化产生变化

11.1 植物和微生物聚糖具有哺乳动物所没有的作用

有些聚糖功能一直保留在整个进化过程，但其他功能则大多是专一性地适应哺乳动物细胞。植物和微生物利用聚糖的方式，同样在哺乳动物细胞中也不多见。虽然植物、真菌和有些细菌也用 N- 连接聚糖合成糖蛋白，但聚糖的加工过程则与哺乳动物寡糖不同。例如，真菌寡糖主要含有甘露糖残基，而在植物的复合寡型糖中掺入了木糖（xylose）（图 11.1）。另外，植物和真菌细胞与哺乳动物细胞不同，植物和真菌细胞都是被包围在含有多糖的细胞壁内。植物糖生物学的另一独特的地方是利用游离的寡糖作为信号传送分子。

➲有关真菌聚糖参见 9.3 节。

所有植物、病毒和细菌都是利用糖识别蛋白质。植物凝集素是熟知的糖识别系统的例子，它们在继续作为如何选择性地结合寡糖的模型。这些植物凝集素同时也是检测聚糖的有力工具。植物和细菌毒素，以及细菌和病毒的糖结合黏附分子，都与哺乳动物细胞表面上的聚糖结合。它们还是微生物和甘露糖结合蛋白表面与哺乳动物天然免疫系统其他部分之间反向

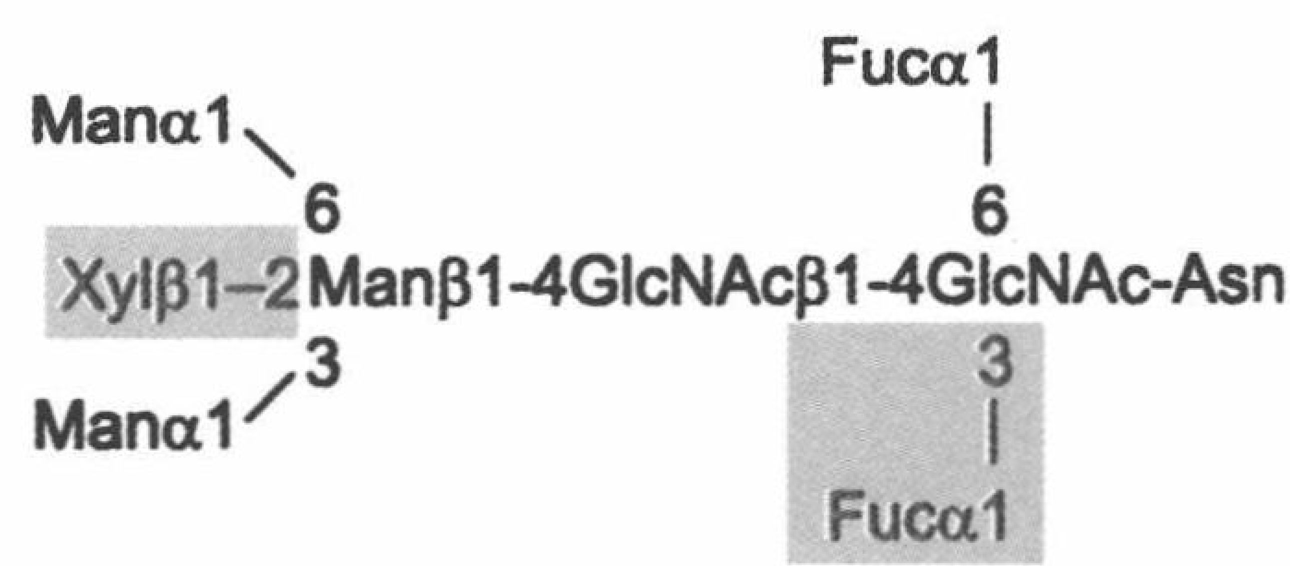


图 11.1　与哺乳动物 N- 连接结构不同的植物 N- 连接聚糖。哺乳动物聚糖中不含 α1-3 连接的岩藻糖和木糖核心残基

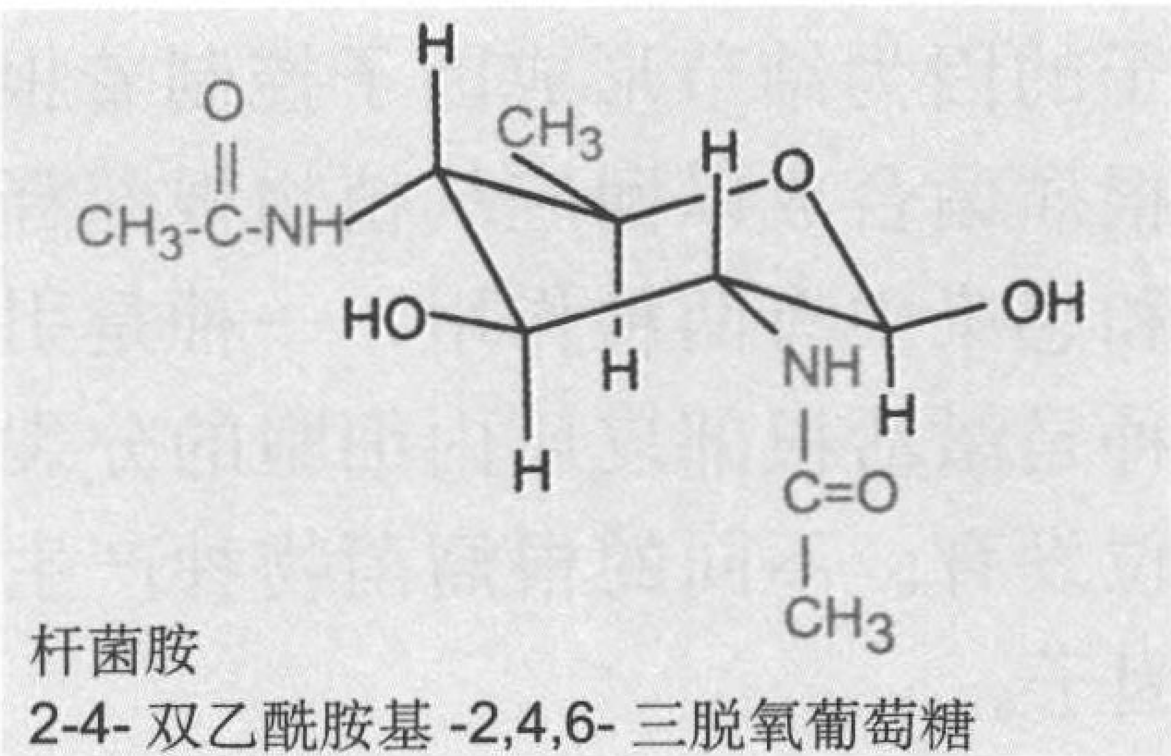
相互作用的代表。

11.2　有些细菌具有与哺乳动物糖基化机构有关的蛋白质糖基化途径

很多年前就知道原核生物中存在 N- 连接和 O- 连接聚糖，但其完整结构的补体系统，及其与真核生物之间的相似性最近才变得清晰可见。有趣的是发现空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）合成糖蛋白中的糖是从脂质连接的中间体转移到糖蛋白 Asn-X-Ser/Thr 序列的，表明这与真核细胞内质网中的糖基化作用非常相似（图 11.2）。这一复合体糖基化所需的全部基因都异常地出现在单个的聚簇中，而且可以转移至大肠杆菌并赋予 N- 连接糖基化蛋白质活性。在转移聚糖和靶序列两方面的详细情况虽然与其真核生物对方不同，但最近的研究表明，可能是为修饰基因簇，以致典型的哺乳动物核心聚糖在细菌中转移。另外，其他细菌种系的有关系统有不同的要求。因此，进一步实行加工，可能为在细菌中生产糖蛋白治疗药物开辟出一条新路。

●有关医药糖蛋白参见 13.5 节。

除 N- 连接糖基化系统外，已知在弯曲杆菌和其他真细菌种系中还有 O- 连接糖基化系统。另外，在古细菌中存在 N- 连接和 O- 连接两种糖基化系统。由此，在生命三界中都发现了糖基化系统。虽然是远距离的相关，如在糖基化途径中的关键性酶，寡糖基转移酶，显示出序列相似性，表明这些糖基化途径有着共同的进化起源。



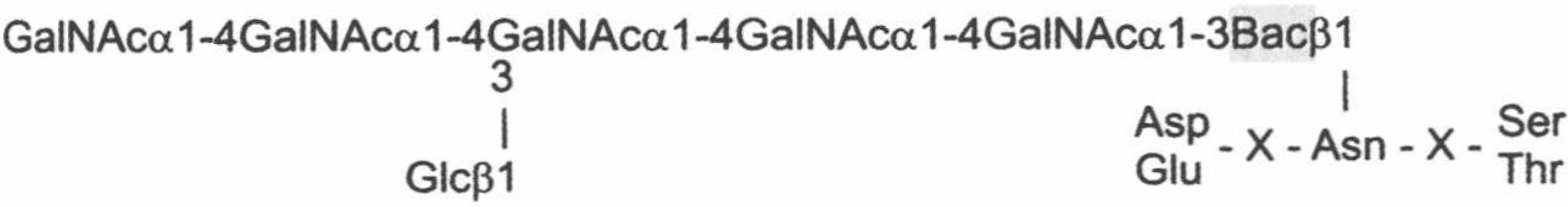


图 11.2 空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）中的 N- 连接糖蛋白。图中举例说明通过芽孢杆菌氨基糖新糖与弯曲杆菌中天冬酰胺残基共有序列结合的聚糖

11.3 植物利用寡糖作为信号传送分子

植物中起信号传送功能的寡糖被称为寡糖素（oligosaccharin）。调节植物生长、发育和具有植保作用的寡糖素，都是从微生物细胞壁或植物本身细胞壁释放的。例如，在应答创伤和感染时，从植物细胞壁多糖中释放的寡聚半乳糖醛酸苷（oligogalacturonide）是 α1-4 连接半乳糖醛酸（galacturonic acid）的寡聚体（图 11.3），当细胞壁遭受机械损伤时，能够产生寡聚半乳糖醛酸，但由创伤诱发的多半乳糖醛酸酶，也能特异地催化寡聚半乳糖醛酸的释放，通过攻击真菌或细菌，也可以由分泌的多半乳糖醛酸酶产生寡聚半乳糖醛酸。释放的寡聚半乳糖醛酸刺激产生保护植物不受病原体和食草动物伤害应答的防御基因转录。这些应答包括强化的遍及质膜的离子流和活性氧簇的形成。植物组织中壳多糖酶分解入侵病原性真菌细胞壁几丁质形成的连接 β1-4GlcNAc 的可溶性寡聚体，同样可以诱发防御应答。

寡糖衍生物还承担着启动豆科植物（豌豆、大豆和有关品种）和固氮菌之间共生关系信号传送分子的任务。根瘤菌（Rhizobial bacteria）在根瘤中生存；可以将大气中的氮还原为植物所用的氨。豆科植物与根瘤菌之间的共生关系是特异的，每一种豆类植物只能感染数目有限的根瘤

菌种。这种特异性是由被称为结节形成因子（Nod factor）*N*-酰基化壳多糖寡聚体赋予的因为结节形成因子控制着根瘤的形成（图 11.3）。结节形成因子由根瘤菌合成以回应从植物根部释放类黄酮。结节形成因子在根瘤菌形成和感染中有两种作用，一种是引发植物根毛变形，启动感染过程。另一种是激活根部皮质内细胞的分裂，导致被细菌入侵的菌瘤从初次感染部位发育。不同的根瘤菌物种产生寡糖基本结构修饰程度不同的结节形成因子。

与哺乳动物激素一样，在浓度很低的情况下，植物信号传送寡糖也具有活性，因而与其结合的受体必然是高亲和力地结合。用植物检测结节形成因子必定涉及植物根部中结节的特异性受体。有人曾用不能产生根瘤的突变豆科植物遗传分析方法鉴定潜在的结节形成因子受体。这类膜结合蛋白质的胞外区含有溶素模体（lysin motif, LysM）结构域，与细菌和真核生物蛋白中发现的结合肽聚糖的结构域类似，并且能够与结节形成因子和胞

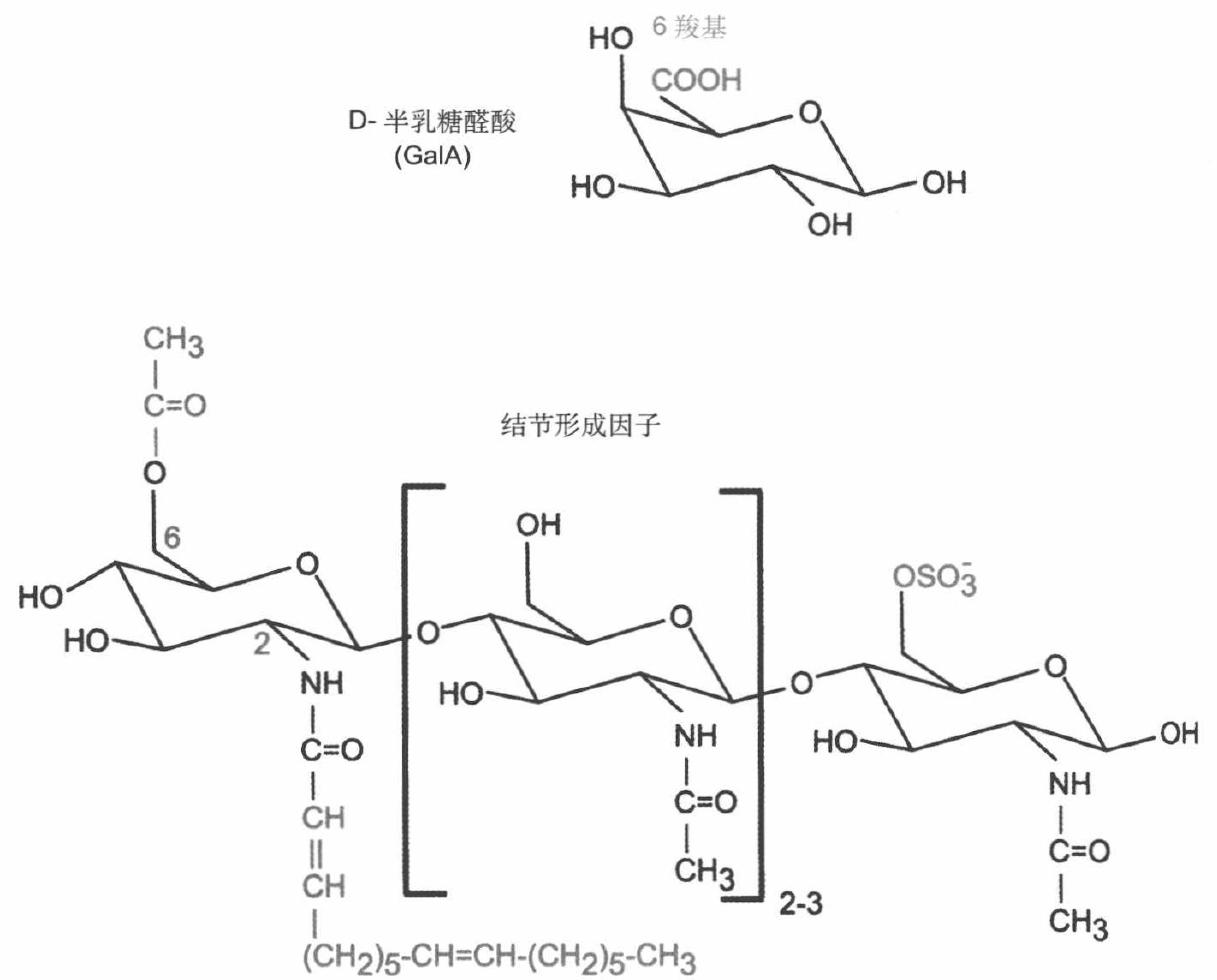


图 11.3　植物中寡糖基信号传送分子。从细胞壁释放和诱发产生防御应答的连接 α1-4 的半乳糖醛酸多聚体。结节形成因子是几丁质的衍生物，一种连接 β1-4 的 GlcNAc 多聚体，产自诱发根毛发育变化的根瘤菌。不同物种根瘤间出现的变异结节形成因子部分，用蓝色表示

内信号传送的丝氨酸 / 苏氨酸激酶结构域结合。但是，导向结节形成因子与受体的结合尚未得到证实。在拟南芥模型植物中，含有结合几丁质寡糖的胞内激酶结构域和胞外 LysM 结构域的类似受体，主要是诱发真菌病原体的防御反应。下面几节将讨论已经鉴定的，主要出现在种子和球根中的植物凝集素，它们并不参与信号传送过程。

11.4　有些植物凝集素成为生物学家有力的工具

种子和植物产物中的凝集素可以防御植物的捕食者和害虫。凝集素诱发的毒性反应常引起胃肠不适和困扰，使动物产生条件反射拒食特种植物。豆科植物凝集素也参与抗拒细菌病原体对种子的侵袭。人们对植物凝集素的认知和研究远早于动物凝集素。

来源于植物家族的凝集素，常形成一组相关的蛋白质，其中虽然有些是与含有甘露糖的寡糖结合，而同一组的另一些成员则与含有半乳糖结构的寡糖结合。各组的凝集素都由特征性折叠模式的多肽链组成。大多数植物凝集素是寡聚体，而且是多价的。构成的多肽链多具有一个以上的糖结合位点，导致在寡聚体中形成簇聚的大型结合部位。这种高度多价性可以说明这些蛋白质介导的高效血细胞凝集作用，还可以作为检测其活性的简便方法（图 11.4）。在凝集素寡聚体相反端部结合位点的位置类似于半乳

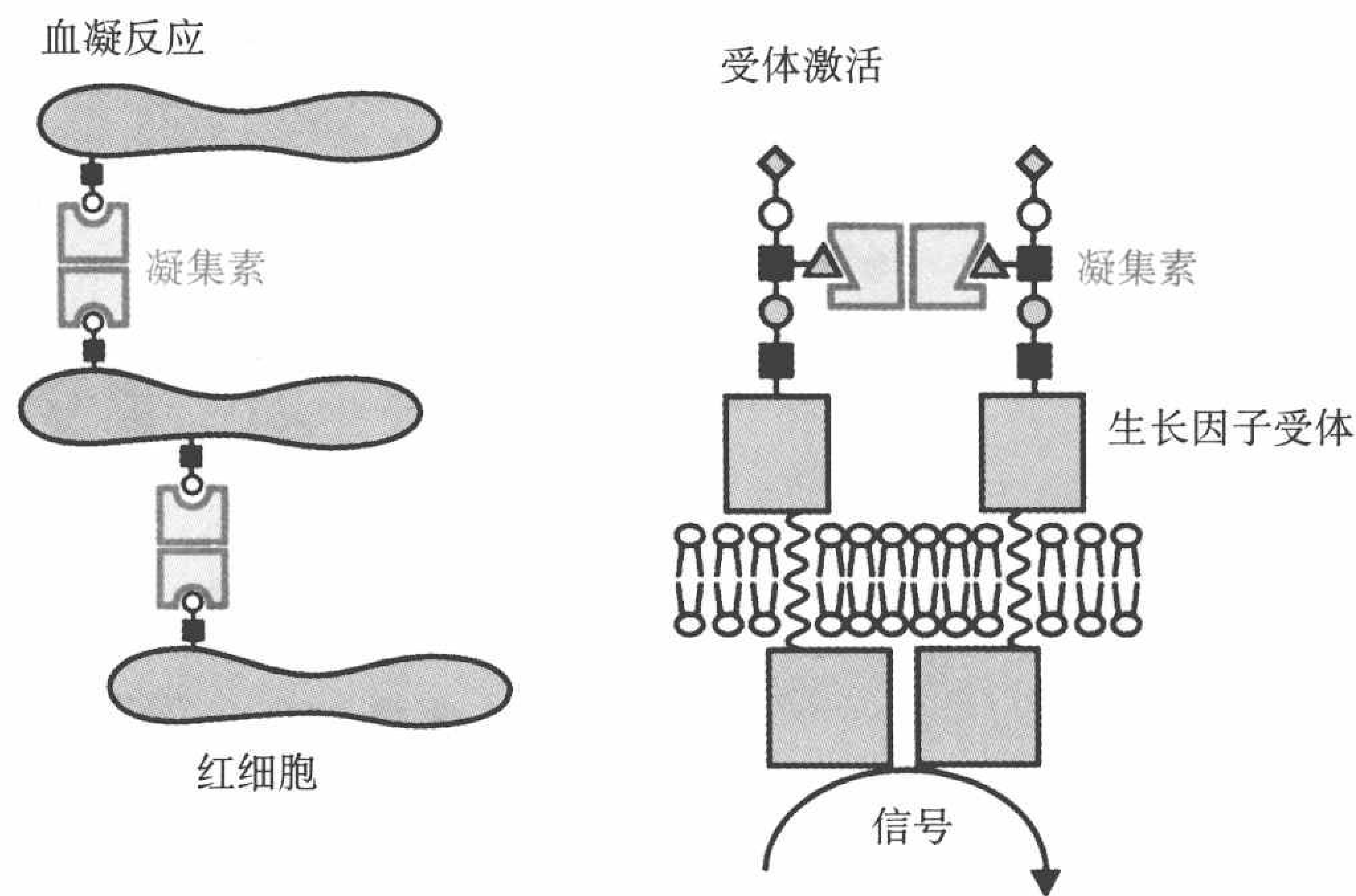


图 11.4　植物凝集素多价性在血凝反应和受体激活中的作用。细胞表面不同的聚糖交联，导致形成细胞的大型集聚体，但在单一细胞两受体分子上聚糖的横向交联，使胞内结构域互相接近，导致聚糖激活

凝素二聚体的配置方式，阐明在血细胞凝集作用试验中，细胞表面之间的桥连性能。

有人已经深入地研究过豆科植物种子中发现的植物凝集素。报道的第一个凝集素是从刀豆中分离的伴刀豆球蛋白 A（concanavalin A,Con A）。伴刀豆球蛋白 A 结合含有甘露糖的寡糖，对出现在 N- 连接聚糖核心的载有分支三甘露糖结构的聚糖，具有特殊的亲和力。在高甘露糖寡糖中，因为有几个这样的分支结构，伴刀豆球蛋白 A 以特殊的高亲和力与这些结构结合。

豆科植物凝集素的亚基都有共同的整体结构，由出现在靠近糖结合位点的两个二价阳离子使其保持稳定（图 11.5）。虽然豆科植物凝集素都是无细胞膜锚的可溶性蛋白质，但这种折叠模式依然在 L- 型动物凝集素（L-type animal lectin）中保留。尽管它们的三级结构具有相似性，但豆科植物凝集素中的亚基配置有所改变。亚基通常至少是二聚体，说明二聚体具有与糖蛋白交联的能力，但二聚体也能进一步缔合形成四聚体。靠近糖结合位点出现的微妙差别，可以解释为不同结合配体广泛特异性的理由。

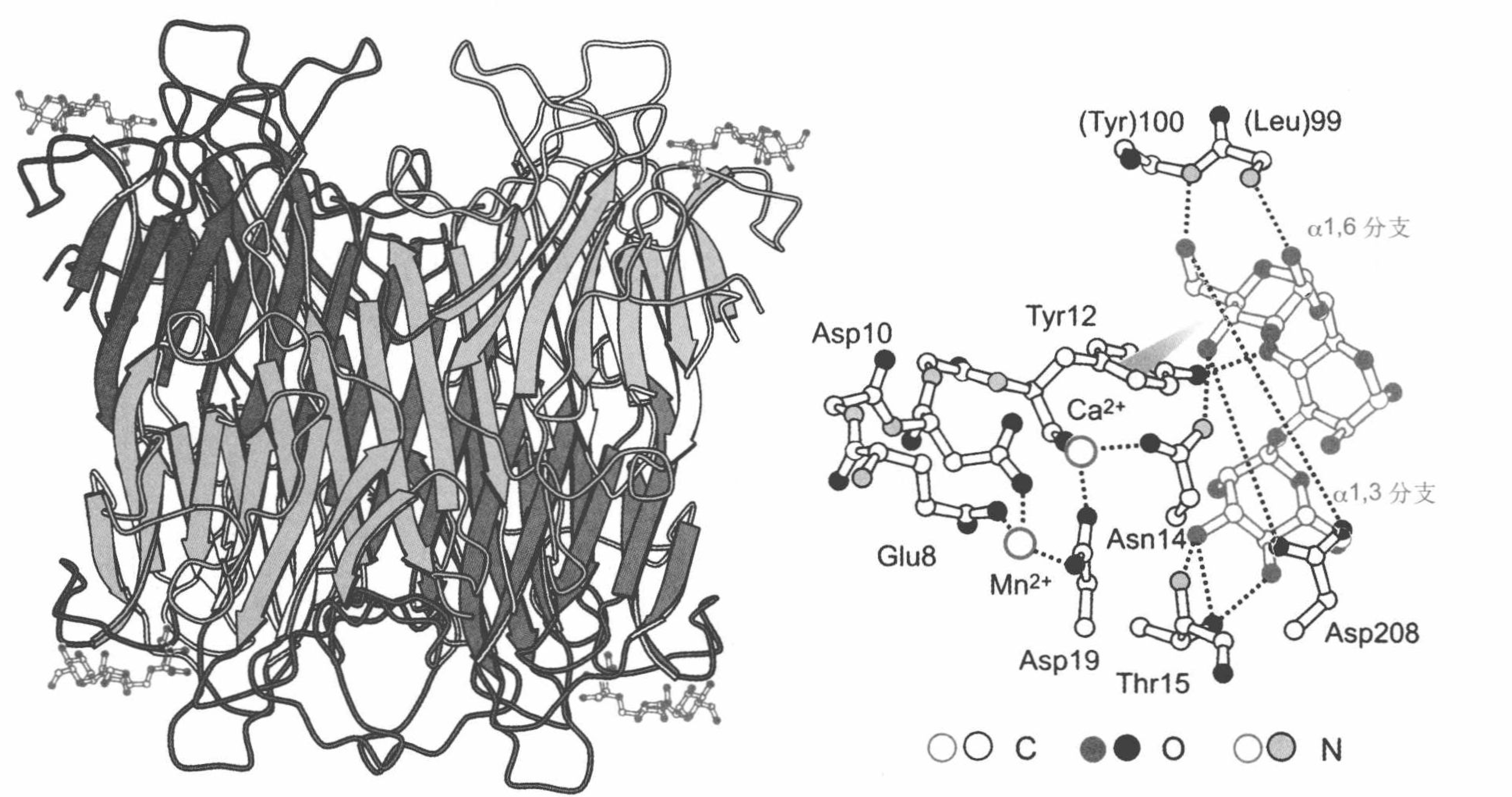


图 11.5　伴刀豆球蛋白 A 整体结构和载有三甘露糖核心结构结合位点的详图。伴刀豆球蛋白以二聚体形成的四聚体形式存在。4 个相同的亚基都含有一个糖结合位点。图中显示，结合三甘露糖结构中的蛋白质残基与甘露糖残基羟基之间形成氢键，以及在 Tyr-12 与甘露糖残基 B 面之间形成疏水包装相互作用。二价阳离子参与保持糖连接反应残基位置的稳定，但不直接与糖相互作用（根据蛋白质数据库 1CVN 条目）

例如，有些豆科植物凝集素，可以以高亲和力地结合出现在肿瘤相关黏蛋白 O- 连接聚糖未唾液酸化核心 1 结构（Galβ1-3 Gal NACβ1-Ser/Thr）。对用于解释不同配体与 C- 型动物凝集素结合的容纳和排斥原理，同样也适用于植物凝集素。

●有关肿瘤的黏蛋白参见 13.8 节。

更有趣的是伴刀豆球蛋白 A 和另一些植物凝集素具有刺激休眠细胞、起始 DNA 合成以及促进有丝分裂的作用。这种促有丝分裂的活性，源自生长因子受体，通过其聚糖部分的交联，模拟天然蛋白质配体影响的结果（图 11.4）。一种能够刺激不同类型细胞的有效制剂，成为广泛用于研究控制细胞生长的工具。植物凝集素刺激细胞表面受体的作用，也为食用未煮熟不同种系豆类中毒的原因做出了解释，是因为未变性凝集素与肠上皮细胞相互作用产生的影响。

植物凝集素的活性，除在细胞层面的用途外，还可以作为生物化学研究实验的工具。例如，固定化凝集素亲和层析法提供了纯化糖蛋白和从糖蛋白衍生寡糖的方法。凝集素与特异性寡糖的结合能力，已成为细胞和组织中广泛应用的检测聚糖的工具。植物凝集素的应用优势是既可以检测完整糖蛋白上也能检测在凝胶 EP 迹格式中或组织上的特异性聚糖。植物凝集素的特异性，也使它们成为广泛应用的诊断试剂。例如，凝集素用作测定 A 型和 B 型血型物质的试剂。

●有关细胞化学中的凝集素参见 6.9 节。

11.5 毒素植物凝集素

一组植物凝集素，如产自蓖麻子的蓖麻毒蛋白（ricin）凝集素由毒素组成。蓖麻毒蛋白及其同源物的糖结合活性为投送毒素到细胞内部提供了一种机制。毒素 A 或称为活性亚基都是从核糖体 RNA 移除一重要碱基的糖水解酶。抑制合成蛋白质的作用引发细胞毒性（图 11.6）。糖结合活性存在于与动物细胞表面糖蛋白上末端半乳糖残基结合的 B 亚基或结合亚基中。在胞吞过程中，当这些蛋白质有些从细胞表面移动至细胞内部时，毒素与这些蛋白质随行。毒素一旦到达腔内区室，遂即通过再次与末端半乳糖残基结合返回内质网。在这种情况下，半乳糖残基可能在从高尔基体向内质网移动携带毒素的钙网蛋白上。在内质网中，毒素被识别为胞质蛋白质降解的靶标，因此通过内质网膜中的通道被输送至胞质。毒素一旦到达胞质中，因为其赖氨酸残基含量低可以逃避降解，得以进入核糖体。

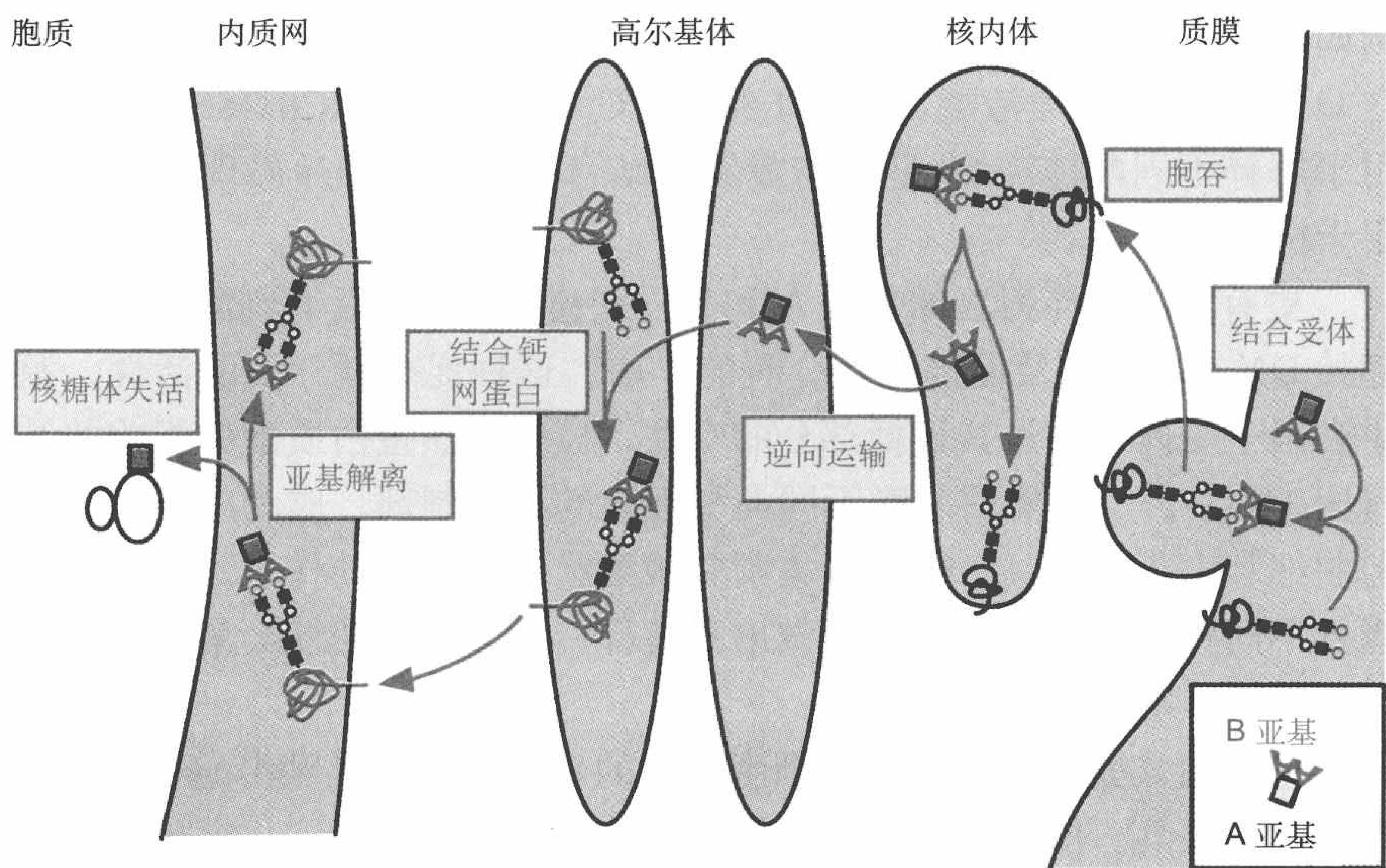


图 11.6　蓖麻毒蛋白在真核生物靶细胞中的运输。蓖麻毒蛋白与细胞表面糖蛋白初始结合，导致进入核内体内化。蓖麻毒蛋白亚基通过高尔基体到内质网的逆向运输取决于，至少部分地取决于结合像在这些区室之间循环的钙网蛋白一样的末端半乳凝素糖蛋白。在内质网中，亚基进行解离，亚基 A 被识别为错折叠蛋白质，并易位至失活核糖体的胞质

蓖麻毒蛋白的 B 亚基含有两个同源的糖结合结构域（标号 1、2），各自在 β- 三叶肽结构中折叠，其中的 3 个圆裂片（分别被称为 α、β、γ）形成于早期的基因复重事件（图 11.7）。虽然这些圆裂片都是同源的，但只有少数几个含有糖结合的活性部位。在两个结构域中，总数 6 个圆裂片中有 3 个（1α、1β 和 2γ）与糖结合。这些裂片中，每个裂片都含有一个堆积在结合位点半乳糖 B 面的重要芳香环残基。这 3 个结合位点的出现可以促进与含多价半乳糖配体高亲和力地结合。

在不同组别的蛋白质中，都发现了蓖麻毒蛋白样糖识别域（R-type CRD）（图 11.6）。细菌中 R- 型糖识别域，与包括糖苷酶在内的水解结构域缔合。这些糖识别域，使水解酶锚固在多糖底物。真核生物细胞中，启动合成 O- 连接聚糖的许多 Gal NAc 转移酶除含有催化结构域外，也含有 R- 型糖识别域。这类结构域识别已与丝氨酸和苏氨酸残基结合的 Gal NAc 残基，并导向邻近的残基继续进行糖基化。最后，蓖麻毒蛋白样结构域也能介导硫酸化糖蛋白激素与哺乳动物甘露糖受体结合。

➲有关 R- 型糖识别域参见 3.4 节和 10.9 节。

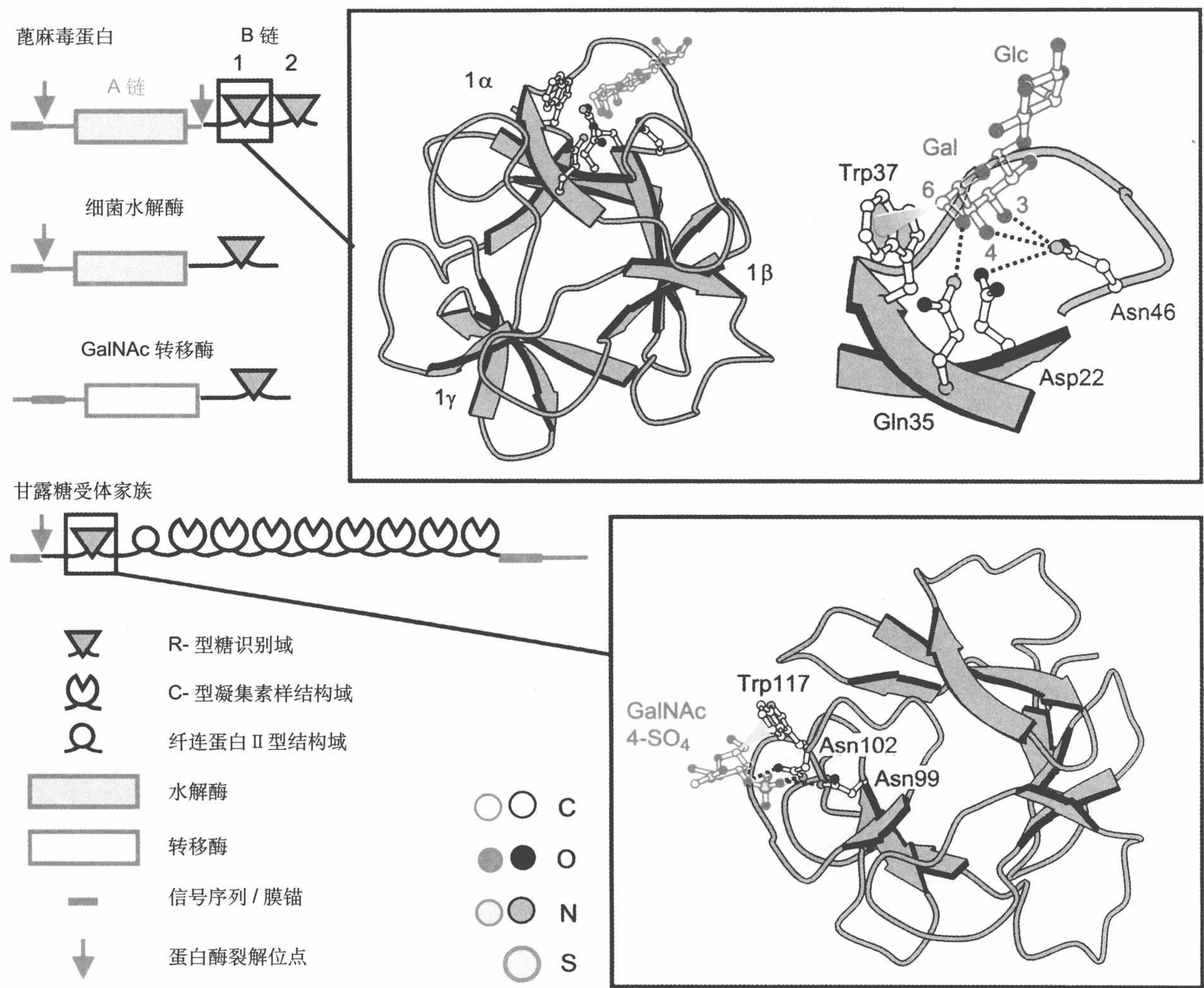


图 11.7　具有蓖麻毒蛋白样 CRD 蛋白质组织、蓖麻毒蛋白亚基 B 结构和甘露糖受体的 R- 型 CRD 结构。蓖麻毒蛋白结合部位详图表明 Trp-37 和半乳糖 B 面之间的疏水包装相互作用。图中也显示与半乳糖羟基形成氢键的残基。另一详图还表明在甘露糖受体 R- 型 CRD 中，Trp-117 和 GalNAc 4- 硫酸 GalNAc 环 B 面之间的疏水作用，以及两天冬酰胺侧链和硫酸基之间的氢键（根据蛋白质数据库的 2AAI 和 1DQO 条目）

11.6　多数细菌毒素是凝集素

虽然多数细菌毒素和蓖麻毒蛋白毒素一样，具有两个亚基组织结构，

但两亚基的序列与蓖麻毒蛋白不同。由单一亚基 A 和 5 个亚基 B 组成的毒素，被称为 AB_5 毒素。AB_5 毒素包括：

- 致病霍乱的霍乱毒素；
- 承担多例食物中毒责任的大肠杆菌肠毒素；
- 致百日咳病的百日咳毒素；
- 致痢疾病的志贺毒素；
- 大肠杆菌的志贺样维罗毒素。

志贺毒素和维罗毒素的亚基 A 与蓖麻毒蛋白亚基 A 抑制蛋白质合成的方式相同。其余毒素的亚基 A 具有腺苷二磷酸 - 核糖基化活性，可将腺苷二磷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸核糖部分转移到异源三聚体 G 蛋白中专一性的氨基酸。产生的刺激作用或信号级联放大干扰导致消化道透水性增强，并因此引发腹泻（图 11.8）。

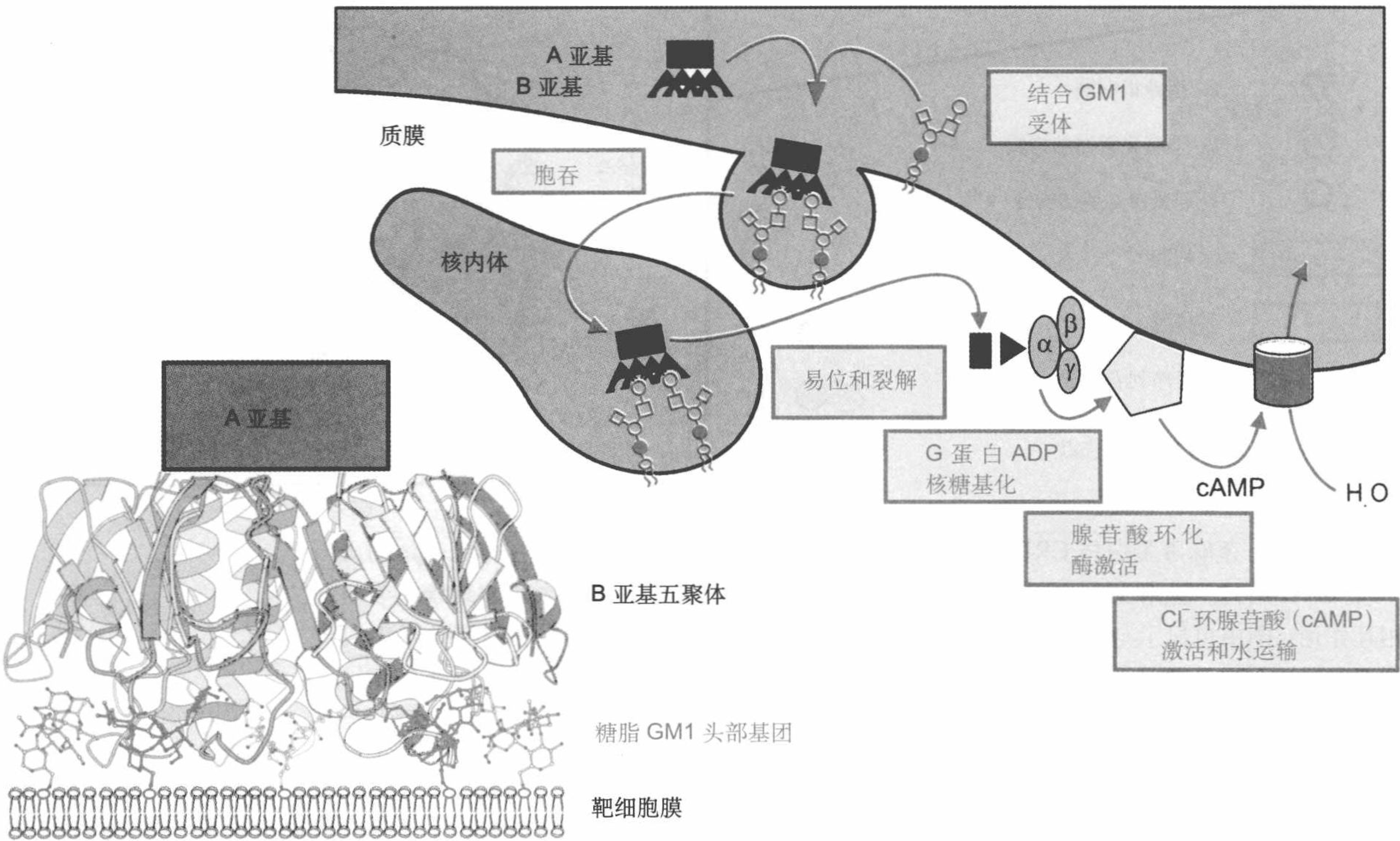


图 11.8 霍乱毒素作用机制。每一 B 亚基与靶细胞膜中分离的糖脂分子（GM1）头部基团五糖相互作用，导致 A 亚基内化和向胞质转移（摘自 Weis, W.I, and Drickamer, K. （1996）. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, Annual Review of Biochemistry 65, 441-473. 根据蛋白质数据库 2CHB 条目）

AB_5 细菌毒素中的每一 A 亚基，与排列成环形的 B 亚基的五聚体缔合。B 亚基通常与细胞表面糖脂类的聚糖结合（图 11.8）。虽然多数毒素 B 亚基的序列彼此有关，但每一毒素细胞表面结合的聚糖类型，多少有些不同。毒素 B 亚基的折叠模式与植物和动物凝集素的不同，但糖识别原理一样。结合部位的关键性相互作用包括紧靠半乳糖和 GalNAc B 面的疏水包装作用、GlcNAc *N*- 乙酰基以及氢键与主要糖羟基的作用。结合部位一般是延伸的，每一亚基可以与多达 5 个糖残基相互作用。细胞表面的结合亲和力，因为 5 个亚基的结合位点，都从寡聚体表面突出，明显的有所增加（图 11.8）。已经制造出为多个毒素亚基与合成的簇聚塘残基相互作用而设计的高亲和力结合毒素抑制剂。

11.7 细菌利用凝集素与宿主细胞表面结合

许多不同类型的细菌，除与细胞表面聚糖结合产生毒素外，还在宿主细胞表面含糖结构上黏附。这种黏附可能是感染致病过程的一部分，或者是一种正常的共存机制。例如，有些大肠杆菌的菌株与肠上皮细胞黏附，形成消化道部分正常的微生物区系，而另一些菌株黏附在尿道上皮细胞，成为病原菌系。这两类大肠杆菌的糖结合部位位于突出细菌表面菌毛（pili）的顶端（图 11.9）。菌毛由内部棒状结构、外部柔韧的挠性节段组成。尖端部分是含有独特 β 桶状延伸糖结合域结构的特殊亚基。

曾对病原性大肠杆菌中两种不同的菌毛进行了详细的研究。一种是位于 1 型菌毛顶端被称为 FimH 和含有甘露糖结构的黏附素（adhesin）。另一种是 P 菌毛上的 PapG 黏附素，是一种与含有 GalNAc 和半乳糖残基（GalNAcβ1-3Galβ1-4 Galβ1-4 Galβ1- 脑酰胺）红细胞糖苷（globoside）头部基团结合的 PapG 形式的黏附素。这一相互作用成为肾脏发病机理中大肠杆菌与肾脏上皮细胞结合的基础。PapG 糖结合结构域的结构，不同于细菌毒素和动物凝集素中糖结合结构域，但都利用了相同的糖识别原理。这种延伸的结合部位，包括与糖脂头部基团中全部 4 个糖环的相互作用，在紧贴半乳糖残基 B 面含有一个关键的色氨酸残基。其余的结合部位，一般情况下为极性。形成蛋白质 - 糖界面的多数氢键，必然包含碱性和酸性氨基酸侧链和糖羟基。在 PapG 相关结构上出现的差异，表明了大肠杆菌特定菌株对不同类型细胞（膀胱或肾脏）和不同种系宿主的趋向性有所不同。

蛋白质和糖之间的相互作用，对其他细菌黏附系统也有一定的影响，

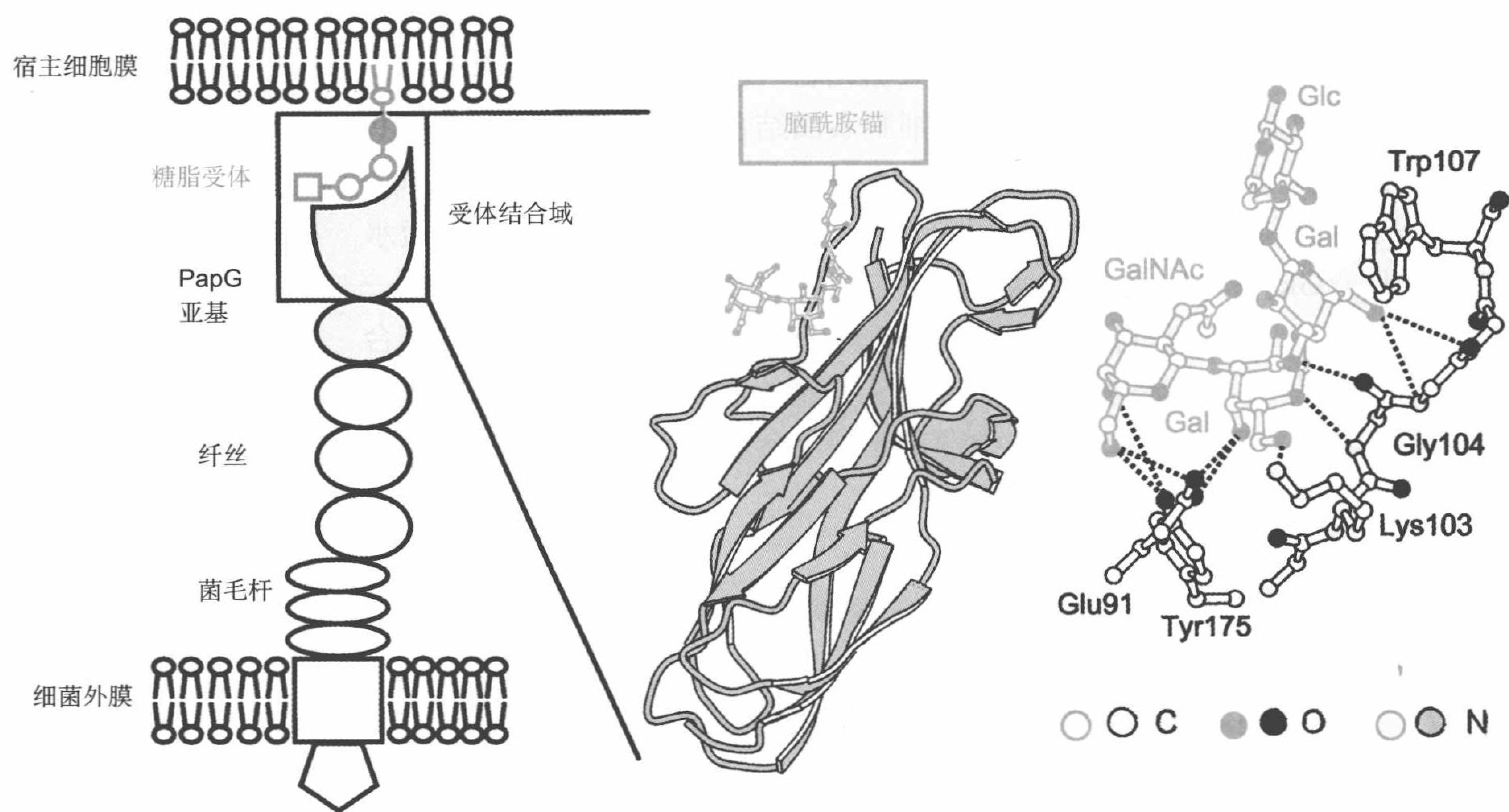


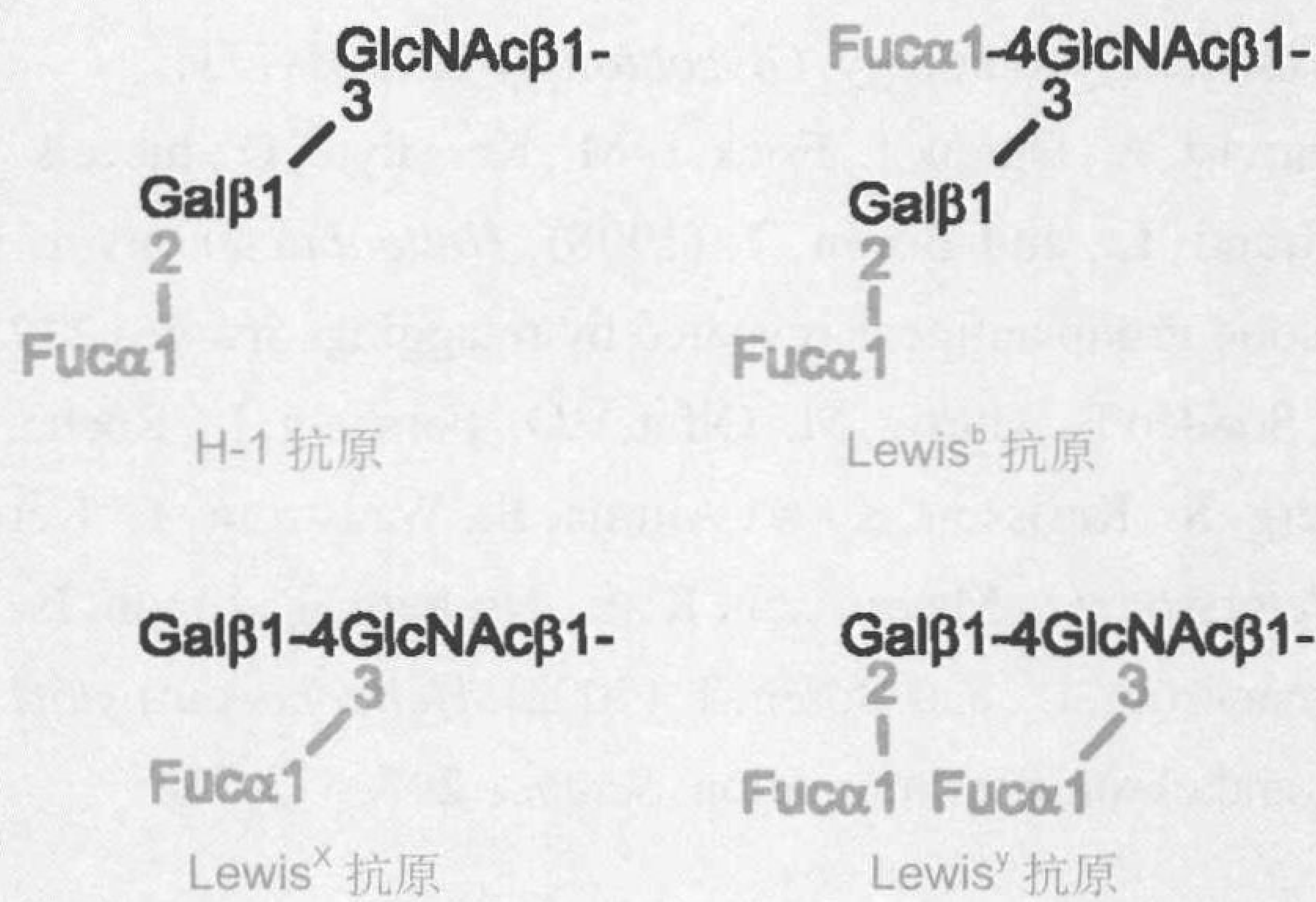
图 11.9　菌毛整体结构图。图中显示亚基的配置和结合糖脂头部寡糖基团 PapG 亚基的受体结合域的结构。菌毛由免疫球蛋白样不完全折叠模式的亚基组装。通过从菌毛下一个亚基插入菌株完成各亚基的 β 片层结构（根据蛋白质数据库 1J8R 条目）

虽然在同等分子水平对其详情还不清楚。细菌与宿主组织之间的相互作用可能比较复杂。例如，与胃溃疡发育有关的幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*），至少可以与胃的两种不同类型细胞的寡糖结构结合（框 11.1）。

框 11.1　疾病糖生物学　*胃溃疡病原菌利用血型聚糖作为受体*

幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）出现在约 1/2 的人群中，在人胃中无性繁殖。大多数感染 *H.pylori* 菌的人群没有出现临床症状，但有些个体感染后，可能发展成胃溃疡，或胃癌。还不清楚决定感染人群染病的因素。螺旋弯曲杆菌与分泌黏液上皮细胞和内衬胃壁表面黏蛋白结合，保护细菌不受胃中酸性环境的影响和防止细菌被清除到胃腔。最具特征性的黏附机理是通过 *Helicobacter* 外膜中的蛋白质与黏蛋白上岩藻糖基化糖结构结合。*Helicobacter* 黏附素 BabA 与出现在 O 型血个体分泌聚糖的 H1- 抗原和二岩藻糖基化 Lewis^b（或 Le^b）有关抗原结合。O 型血人群比其他血型的个体更容易引发胃溃疡，表明与 H 和 Lewis^b 抗原黏附可能疾病感染更为严重。

另一 *Helicobacter* 蛋白质 SabA 结合唾液酸 -Lewis^x。正常胃组织中的糖蛋白或糖脂一般不表达唾液酸 -Lewis^x，但在发炎过程中，包括由 *H. pylori* 感染引起的炎症在内，唾液酸 -Lewis^x 的表达大为增加。因此，认为螺杆菌对唾液酸 -Lewis^x 的黏附是感染毒性和长期保持感染的重要原因。



有意思的是在幽门螺杆菌细胞表面也表达血型聚糖。与其他革兰氏阴性菌一样，螺杆菌细胞壁同样含有脂多糖。脂多糖是由脂质 A 连接寡糖核心上的多糖链组成的大分子。脂质 A 插入外膜，多糖突出细胞表面。脂多糖糖部分的结构，随菌种和菌株的变化而改变。大多数幽门螺杆菌株表达与其脂多糖上最常见的 Lewis^x（Le^x）和 Lewis^y（Le^y）抗原相同的路易斯血型抗原结构。幽门螺杆菌基因组编码合成路易斯抗原所需的三个岩藻糖基转移酶。

还不清楚为什么螺杆菌合成这 3 个糖结构。一种可能是，脂多糖上的路易斯抗原，通过胃上皮细胞的受体参与了细菌的黏附。但是，最近实验测定表明，脂多糖在 *H. pylori* 与胃上皮细胞黏附中的作用很小。另一种可能是与人相同抗原糖结构的表达，有助于 *H. pylori* 逃避宿主的免疫应答。但是同样没有证据证实这方面的作用。表达 Lewis^x 或 Lewis^y 的 *H. pylori* 菌株能与在树突细胞表面出现的 C- 型凝集素 DC-SIGN 结合（参见第 9 章）。体外实验表明 *H. pylori* 与 DC-SIGN 相互作用降低树突细胞对 T 辅助细胞的刺激作用。因此，螺杆菌脂多糖上路易斯抗原可能通过与胃中树突细胞 DC-SIGN 的结合抑制免疫应答。

抗生素可以用于医治胃溃疡，但是广泛使用抗生素不利于预防和根治螺杆菌感染，因为有产生抗药性菌株发育的风险。需要另有治疗对策，包括研发抗螺杆菌糖结合黏附素的疫苗，或者可服用的抗黏附的糖类。这两种医疗措施通过阻止螺杆菌与胃黏膜层之间的相互作用，防止胃的建群。

论述题

- 如何鉴定螺杆菌结合聚糖的黏附素。评论聚糖 - 蛋白质相互作用在感染螺杆菌和发展为胃炎时的重要性。

主要文献

- Bergmann, M.P., Engering, A., Smits, H. H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A.,

Wirthe, H.-P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., van Kooyk, Y., and Appelmelk, B.J. (2004). *Helicobacter pylori modulates* the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interactions between lipopolysaccharide and DC-SIGN, *Journal of Experimental Medicine* **200**, 979-990.

• Karlsson, K.-A. (2000). The human gastric colonizer Helicobacter pylori: a challenge for hostparasite glycobiology, *Glycobiology* **10**, 761-771.

• Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I.-M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Borén, T. (1998). *Helicobacter plyori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging, *Science* **279**, 373-377.

• Mahdavi, J., Sondén B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N. Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.-A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.-E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist. A., Hammarström, L., and Borén, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**, 573-578.

11.8　病毒利用凝集素靶向细胞表面

病毒是从结合细胞表面聚糖开始，启动对真核细胞的感染。与细胞表面上的糖蛋白和糖脂上末端唾液酸残基结合的病毒是人们熟知的例子。对流感病毒表面蛋白质与含有唾液酸配体在分子层面上的相互作用曾进行过广泛深入的研究。这种由流感病毒感染导致的相互结合作用是由一种三聚体血凝素介导的，并围绕病毒衣壳脂双层膜外表面形成刺突（图 11.10）。血凝素因能够以植物凝集素同样的方式交联红细胞而得名。血凝素三聚体是一种延伸分子，在分子末端有 3 个突出病毒膜的唾液酸结合位点。血凝素除具有结合唾液酸的活性外，还具有启动进入宿主细胞的膜融合活性。

血凝素多肽链中的结合位点都相对较浅，主要是与连接半乳糖的末端唾液酸残基相互作用。虽然血凝素的整体折叠模式与已知的细菌、植物或动物凝集素不一样，但作为细胞表面识别的基本原理与已经讨论过的凝集素没有什么不同。结合部位的关键相互作用包括结合位点底部紧靠色氨酸 *N*- 乙酰侧链的包装，以及极性和协同氢键与甘油侧链和羧基的相互作用。单体唾液酸苷呈弱亲和力（mmol/L 级亲和力），但通过靶细胞上多个血凝素结合位点同时与多个唾液酸残基的相互作用，亲和力可以增强。

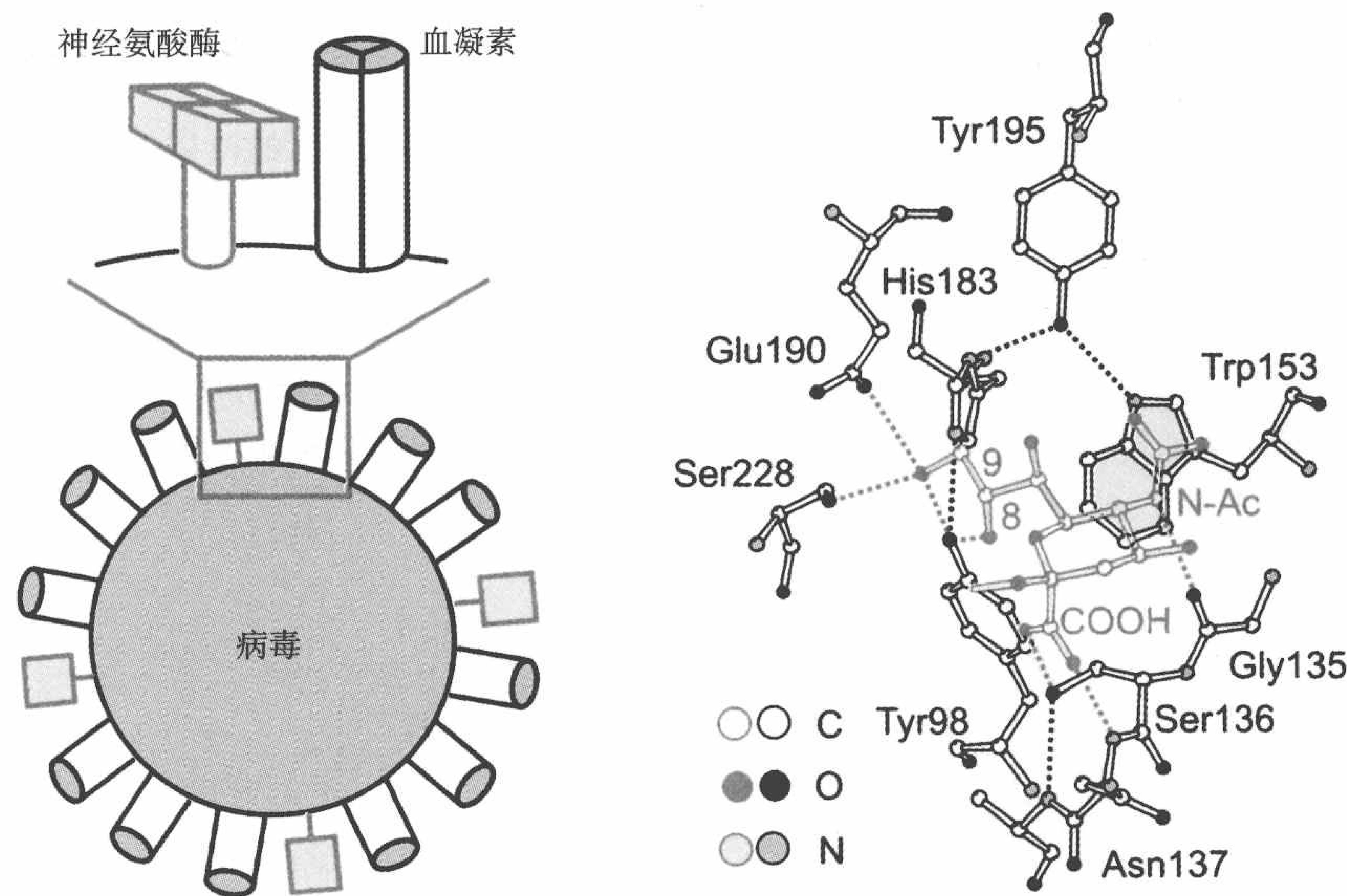


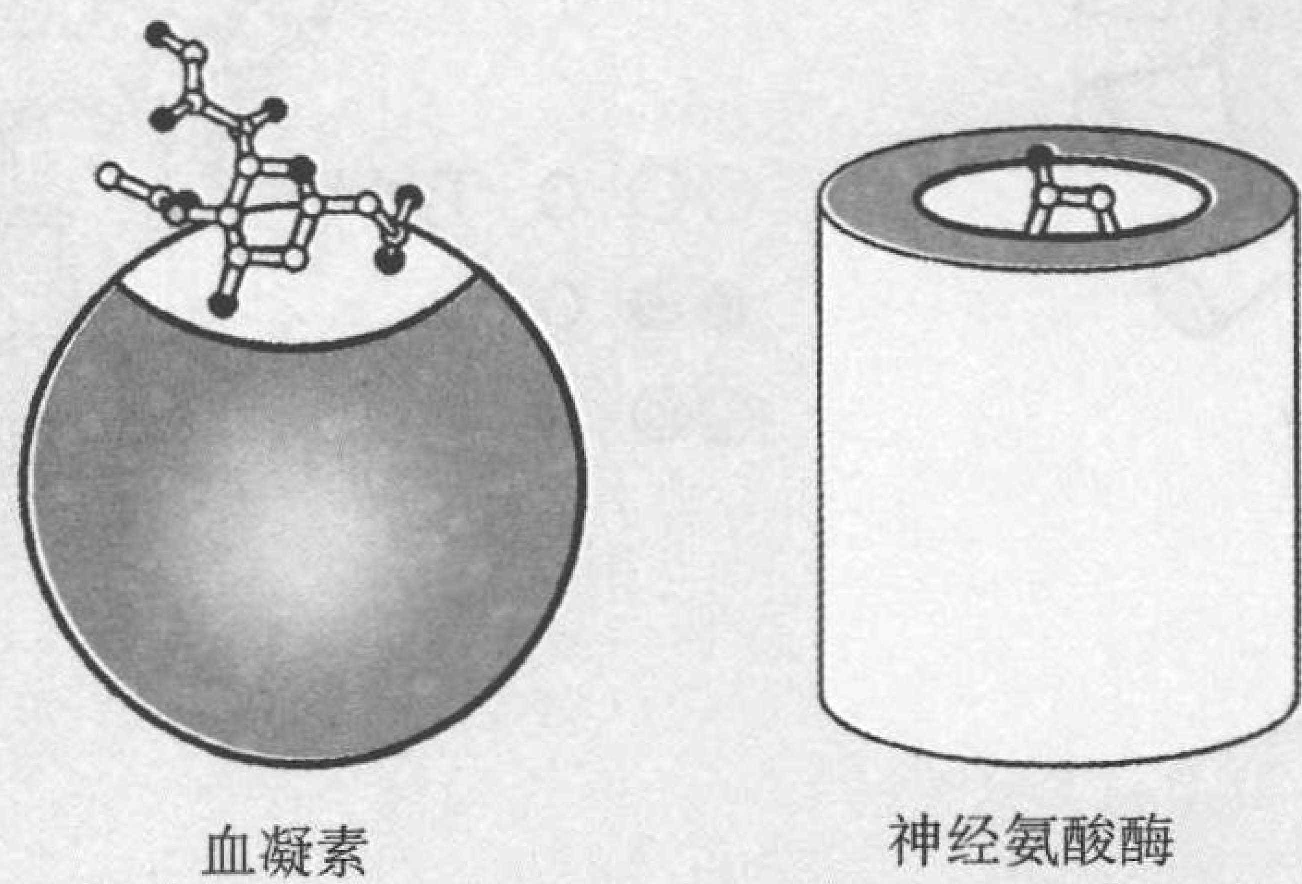
图 11.10　具有三聚体血凝素和四聚体神经氨酸酶刺突的流感病毒衣壳。详图表示血凝素顶部唾液酸结合位点，突出显示在 2- 乙酰胺取代基上甲基色氨酸的疏水包装和甘油侧链的氢键和羧基（根据蛋白质数据库 1HGG 条目）。

流感病毒颗粒表面的第二个分子——四聚体神经氨酸酶（唾液酸酶）分子，在病毒表面上形成小型刺突。当血凝素参与进入细胞时，需要神经氨酸酶从感染细胞有效地释放新生成的病毒颗粒，否则病毒颗粒将通过血凝素与唾液酸的结合被保留在生成的细胞上。对于病毒携带的酶会破坏其结合的受体似乎很难理解，但是，由感染细胞释放的大量病毒能够有效地清除唾液酸，并且可以自由地继续向其他细胞移动，到达新宿主的单一病毒上的神经氨酸酶不足以清除靶细胞表面大量的唾液酸残基，从而保证血凝素能够结合，并且启动膜融合和进入。流感病毒神经氨酸酶是用于限制病毒感染的抗病毒药物的靶标（框 11.2）。

框 11.2 糖治疗药物 *抗流感药物是神经氨酸酶抑制剂*

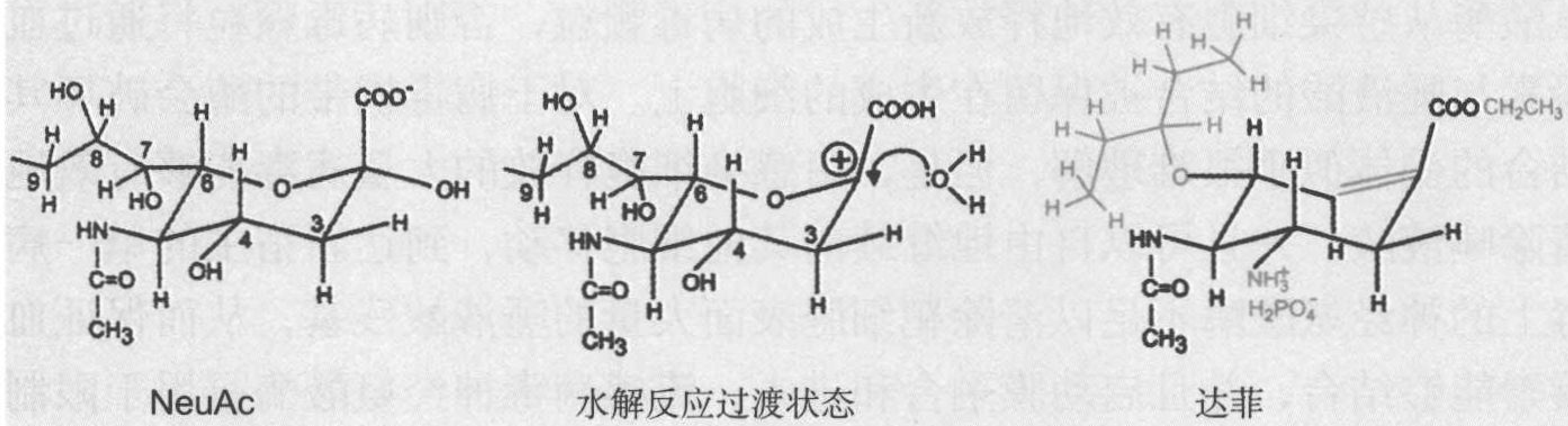
神经氨酸酶的活性部位处于比血凝素上唾液酸结合部位更深的口袋里（图 A），因此，神经氨酸酶对底物的亲和力在微摩尔范围，而血凝素对唾液酸的亲和力为毫摩尔范围，相比之下，血凝素对唾液酸的亲和力弱千倍。一般情况下，设计一种像神经氨酸酶在深口袋中多个相互作用的低分子质量抑制剂，要比设计血凝素浅槽中的抑制剂容易。由于这些因素，在设计预防病毒传播药物作为靶标时，神经氨酸酶比血凝素更具吸引力。因此，神经氨酸酶成为设计抗病毒药物的首要目标。

图 A



另外，因为神经氨酸酶是一种酶，仿照唾液酸苷结合在水解反应过渡状态下设计的抑制剂具有特别高的亲和力。糖苷键在水解过程中，2 位的碳呈平面形状，通过对这一碳原子插入双键可以模拟这一形状（图 B）。目前已批准生产的抗流感病毒药物，奥司他韦（oseltamivir）（亦称达菲，tamiflu）在其他方面的创新，包括在产品中添加抗裂解的制剂，增加神经氨酸酶相互作用的活性位点和简化合成过程。

图 B



神经氨酸酶抑制剂可以有效地防止从感染细胞释放病毒，从而抑制细胞对细胞的传染。这类药物目前销售用于治疗流感病毒早期感染。但所关注的是病毒在抑制剂选择性压力下可能突变产生抗药性。妨碍药物结合的多种突变，预计可能降低神经氨酸从感染细胞释放病毒的药效。虽然有证据表明可能出现产生抗药性的病毒，但药物仍对病毒有杀伤力。最近从多种病毒株神经氨酸酶的结构分析中发现出现了

多种形式的病毒，这对设计下一代抑制剂具有指导意义。

看起来，虽然通过封闭病毒进入宿主的入口可以有效地阻止病毒血凝素与宿主聚糖相互作用，但是制造低分子质量血凝素 - 受体相互作用的抑制剂还有困难。血凝素中只有结合多个结合位点的大分子寡糖配体才有足够亲和力阻止病毒结合。合成这种大分子配体和这种配体制成口服药物都有一定的困难。

论述题

• 论述奥司他韦（oseltamivir）（又名达菲，tamiflu） 和扎那米伟（zanamivir）（又名瑞乐沙 Relenza） 两种抗流感药物特性的异同。

主要文献

• Gubareva, L.V. (2004). Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors, *Virus Research* **103**, 119-203.

• Russell, R.J., Haire, L.F., Stevens, D.J. Collins, P.J., Lin, Y.P., Blackburn, G.M., Hay, A.J., Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design, *Nature* **443**, 45-49.

• Wade, R.C. (1997). Flu' and structure-based drug design, *Structure* **5**, 1139-1145.

决定流感病毒感染流行和大流行周期的主要因素是血凝素和神经氨酸表面抗原位点的进化。这种抗原位点的变异形成了不同病毒分支。例如，H1N1 和 H5N1 病毒株的血凝素抗原具有显著的区别，一般情况下，某一病毒株的抗体对另一病毒不起保护作用。负责这类差别的突变都远离血凝素中唾液酸结合位点和神经氨酸酶的活性位点。

但是，血凝素结合位点的另一特性与物种间病毒的活动能力直接相关。不同的流感病毒株都优先与宿主上皮细胞血凝素专一性唾液酸共有的 α2-3 或 α2-6 连键结合。人流感病毒高效率地与出现在气管内上皮细胞和上呼吸道其他部分 α2-6 连键的 NeuAc 结合，而鸟流感病毒可以很好地结合鸟肠中 α2-3 连键的 NeuAc。这种专一性的差别形成了物种之间病毒活动的屏障。虽然在猪气管内发现了 α2-3 和 α2-6 两种连接的唾液酸，这一事实可以解释为什么猪可以作为中间宿主，其中的基因来自人、鸟混合物种。在人型和鸟型神经氨酸酶之间氨基酸序列的变化决定了 α2-3 或 α2-6 连接唾液酸的专一性不同（图 11.11），表明只要基因出现有限的变化，病毒就能改变其宿主的范围。

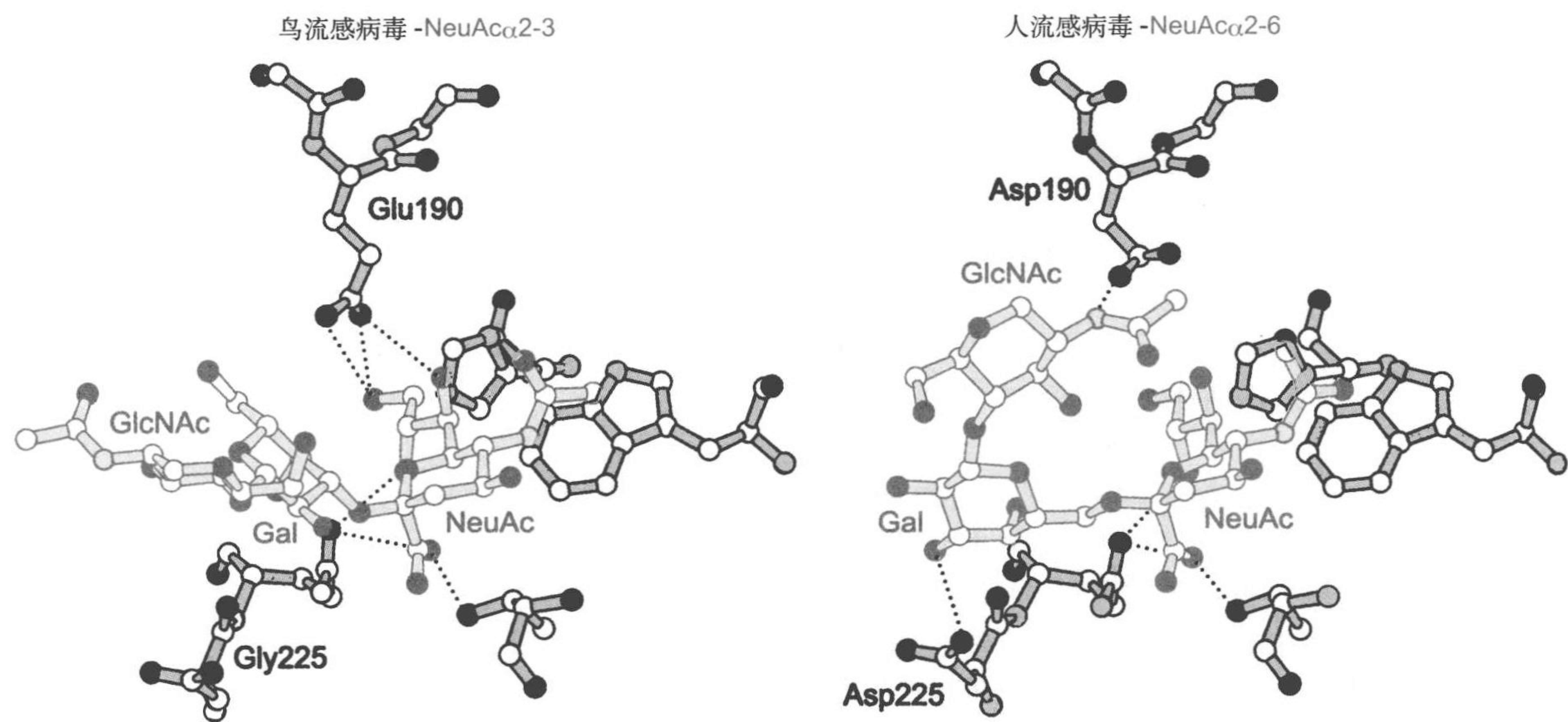


图 11.11 人流感病毒和鸟流感病毒血凝素结构之间的区别。人流感病毒对 NeuAc α2-6-Galα1-4GlcNAc 的专一性取决于配体 *N*- 乙酰乳糖胺部分与 Asp190 和 Asp225 侧链有利的相互作用，而 NeuAc β2-3-Galβ1-4GlcNAc 中 *N*- 乙酰乳糖胺单位的不同取向导致 Glu-190 的大型侧链与配体作用，Gly225 残基不再与鸟病毒血凝素中的配体相互作用。（摘自 Stevens, J., Blot, O., Glaser, L., Tauberger, J.K., Palese, P., Paulson, J.C.,Wilson, I.A.（2005）.Glycan microarray analysis of the haemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. Journal of Molecular Biology 355: 1143-1155 和根据蛋白质数据库 1RVX 和 1RVY 条目）

11.9 进化早期出现的凝集素在高等生物中具有多种功能

在细菌、植物以及动物中发现凝集素这一事实表明，在进化早期凝集素就已出现。对脊椎动物、非脊椎动物、植物和真核及原核生物两种微生物基因组序列进行对比，可以确定不同结构凝集素的进化期（图 11.12）。在所有多细胞真核生物和有些酵母中都发现了钙连蛋白和钙网蛋白。在糖蛋白质量控制中蛋白质的作用，好像在 N- 连接糖基化途径形成时期就已经进化。因此，为糖蛋白分拣和质量控制提供标签，可能是真核细胞在这一途径中最早的功能之一。

多细胞真核生物中其他腔内凝集素的分布和功能变化很大。例如，L- 型凝集素在动物中参与蛋白质分拣，而在植物中则有护卫宿主的作用。

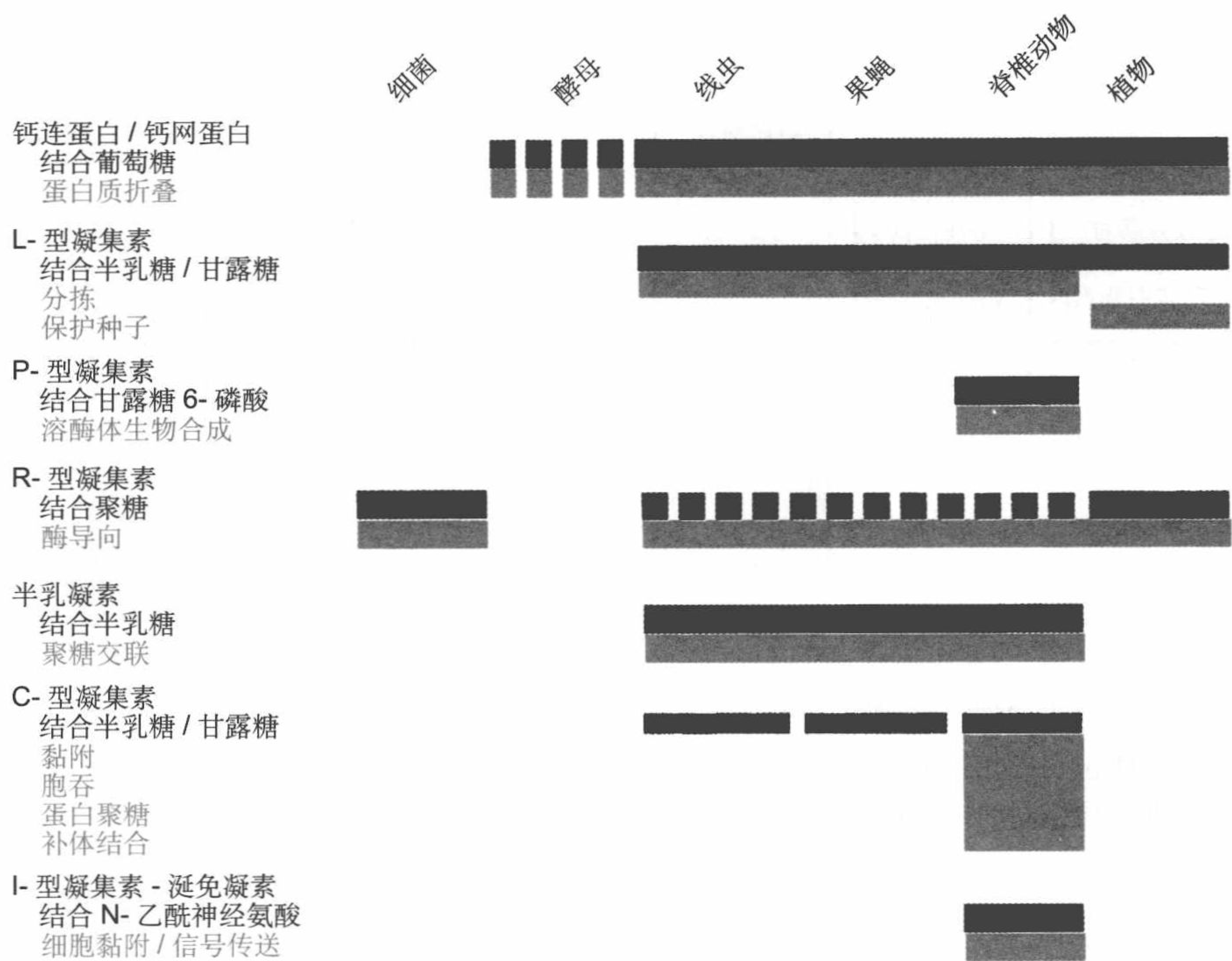


图 11.12　各类凝集素的进化。黑色条表示具有糖结合活性的特殊类型凝集素，蓝色表示这些凝集素的生物学功能已得到证实

R- 型糖识别域是原核和真核生物中唯一得到证实的糖结合结构域。在结构和糖结合功能方面的高度保守，表明编码 R- 型糖识别域的基因最近可能已在物种间横向活动。已在无脊椎动物和酵母蛋白质中发现，结构上与甘露糖 -6 磷酸受体相关的结构域，但是，这些结构域中没有可以形成糖结合位点的残基。在没有受体的情况下，能够产生溶酶体的这一事实，表明脊椎动物细胞中肯定另有被取代的途径信号。

在脊椎和非脊椎动物中都发现了半乳凝素和 C- 型凝集素这两组主要的胞外动物凝集素，但在植物和酵母中没有发现。这两组动物专一性凝集素的进化模式不同（图 11.13）。与很多腔内凝集素一样，在所有研究过的物种中，半乳凝素都是相对保守的。与之相比，C- 型凝集素则可以在脊椎和无脊椎动物中自由传播。虽然 C- 型糖识别域（C-type CRD）是动物基因组共通的特征，但它在不同的动物中，具有不同的功能。涎免凝素（siglecs）只出现在脊椎动物中。因此，有些糖的识别功能是真核生物古老而又普遍

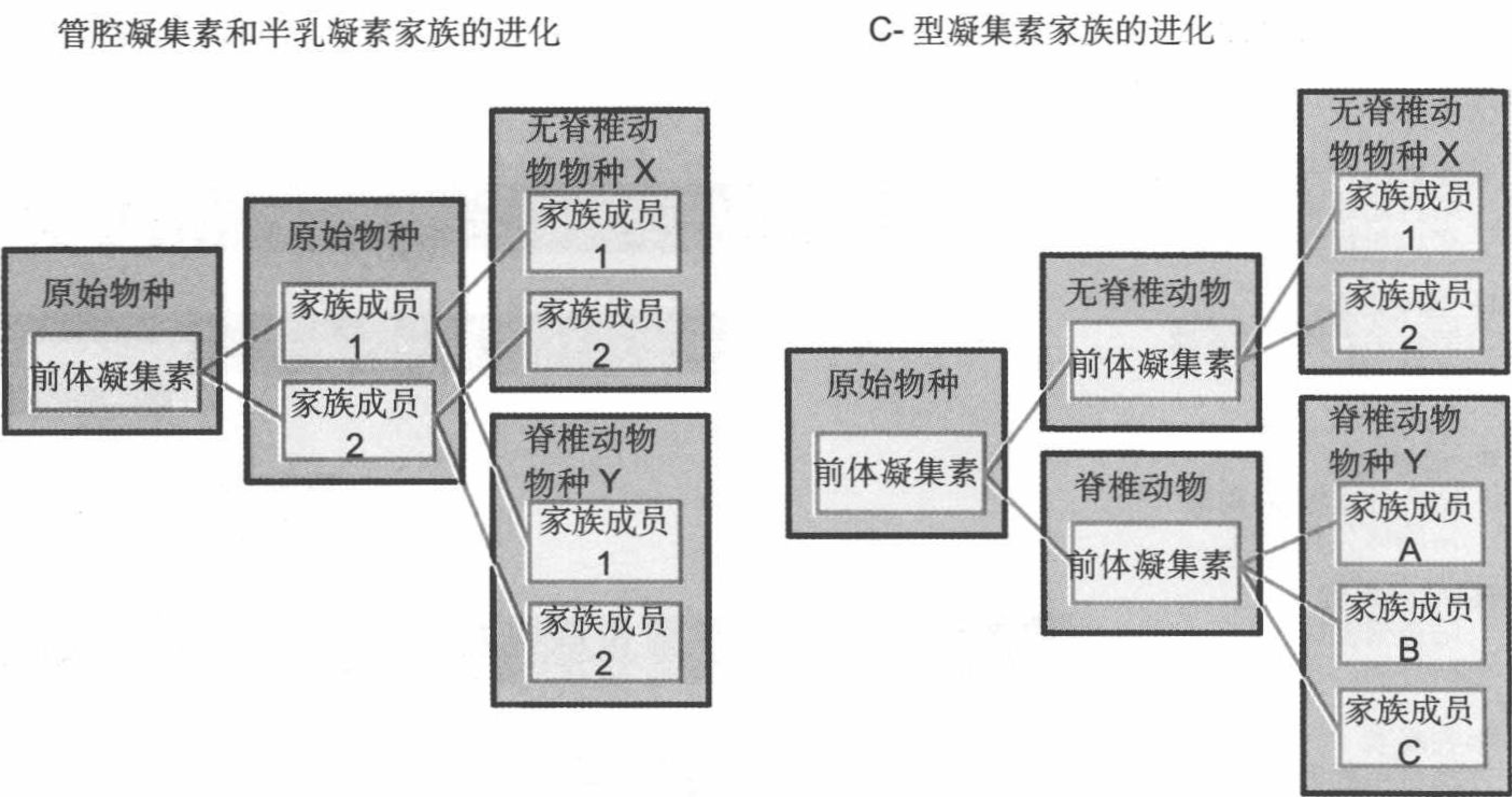


图 11.13 不同类型凝集素的进化。在脊椎动物和无脊椎动物许多管腔凝集素和半乳凝素中都能识别出相同的种间同源蛋白质，与其相比脊椎动物 C- 型凝集素中没有任何与无脊椎动物相同的定向进化同源 C- 型凝集素

的组成部分，而其他的则是对脊椎动物最近的特异糖识别功能的详细阐述。

尽管凝集素家族 CRD 整体折叠模式不同，但糖识别原理显然相同。由于疏水包装相互作用和与不同糖配体特征性羟基形成氢键和配位键的相互作用比较少，单糖配体的亲和力也相对较弱。通过容纳一类组合配体和排斥另一类组合配体实现专一性。通过单一的糖识别域结合位点的延伸和凝集素寡聚体中多个结合位点的簇聚，可以实现糖识别域的高亲和力和高选择性。在这种情况下，化合价的增加导致产生高亲和力，寡聚体的几何形状则为特异型配体提供选择性。这些糖结合位点的特征意味着可能在各种蛋白质的构架中出现，而且很难单纯地从序列分析中检测。因此，可能还有很多凝集素家族有待发现。

小 结

植物利用细胞壁的寡糖作为信号传送分子和细菌利用哺乳动物细胞表面聚糖作为病毒的受体，说明聚糖如何在进化过程中适应新功能。有趣的是本章描述的许多非哺乳动物凝集素，都能结合类似或相同于哺乳动物凝集素识别的聚糖结构。豆类植物凝集素中的 L- 型糖识别域和蓖麻毒蛋白中的 R- 型糖识别域，

为哺乳动物和非哺乳动物糖结合蛋白共同起源提供了证明。另外有情况表明，糖结合活性好像是在新生蛋白质折叠模式背景下单独形成的。尽管如此，通过延伸和组合实现高亲和力的单糖浅、弱的结合位点，在各生物体的分支中重复出现，以及糖和蛋白质相互作用的这些主题，都取决于相同的氢键和疏水相互作用。从生物学观点出发，重要的是牢记哺乳动物聚糖不仅与内源性受体协同进化，也与本章讨论的各种非哺乳动物聚糖和受体共同进化。在有些情况下，选择可能对规避病原体的变化有利，但另外有些事例表明，为了保持互利的相互作用，也需要对聚糖的保育。

主要参考文献

Beddoe, T., Paton, A. W., Le Nours, J., Rosiohn, J., and Paton, J. C. (2010). Structure, biological functions and applications ofthe AB_5 toxins, *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 411-418. 一篇关于糖结合细菌毒素的论文，包括了对其晶体结构的详细介绍。

Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L., and Loris, R. (1999). Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates, *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 572-577. 一篇回顾性文章介绍了不同类型植物凝集素进行糖识别的结构基础。

Day, P.J., Owens, S. R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L. M., and Lord, J. M. (2001). An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7202-7208. 证实钙网蛋白在内质网反向运输过程中作为蓖麻毒蛋白载体的实验。

Dodd, R. B. and Drickamer, K. (2000). Lectin-like proteins in model organisms：implications for evolution of carbohydrate-binding activity,*Glycobiology* **11**, 71R-79R. 在酵母、果蝇、秀丽隐杆线虫基因组中签定出的凝集素的比较分析。

Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren. S. J., and Waksman, G. （2001）. Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor, *Cell* **105**, 733-743. 与其红细胞糖苷酶配体复合的 PapG 晶体结构分析，为进入这一宿主病原体相互作用提供了深入的理解。

Hamel, L. -P. and Beaudoin, N. (2010). Chitooligosaccharide sensing and downstream signal ling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions, *Planta* **232**, 787-806. 参与植物中寡糖信号传递分子事件的最新评论性文章。

Linton, D., Dorrell, N., Hitchen, P.G., Amber,S., Karlyshev, A. V, Morris, H. R., Dell, A., Wren,A. B. and Aebi, M. (2005). Functional analysis of the

Campylobacterjejuni N-linked protein glvcosylation pathway, *Molecular Microbiology* **55**, 1695-1703. 界定弯曲杆菌 N- 连接糖基化途径中聚糖和酶的实验。

Lis, H. and Sharon, N. (1998). Lectins：carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chemical Reviews* **98**, 637-674. 包括植物和微生物凝集素在内的广泛凝集素的评论性文章。

Lord, J.M. and Roberts, L. M. (1998). Retrograde transport: going against the flow, *Current Biology* **8**, R56-R58. 一篇关于从高尔基体返回内质网运输的短篇报道。

Promé, J.-C. (1996). Signalling events elicited in plants by defined oligosaccharide structures, *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 671-678. 评论了寡糖在植物中作为信号传递分子。

Sandvig, K. and van Deurs, B. (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells：molecular mech anisms and medical perspectives, *EMBO Journal* **19**, 5943-5950. 详细评论了两种糖结合毒素（志贺毒素和蓖麻毒蛋白毒素）的作用机制。

Sauer, F.G., Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S.D.,Waksman, G., and Hultgren. S J. (2000). Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment, *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 548-556. 详细评论了菌毛黏附蛋白的结构和功能。

Steeves, R.M., Denton, M.E., Barnard, F.C., Henry, A., and Lambert, J. M. (1999). Identiffcation of three oligosaccharide binding sites in ricin, *Biochemistry* **38**, 11677-11685. 关于蓖麻毒蛋白亲和力标记的研究论文。

Stevens, J., Blixt, O., Glaser, L., Taubenberger, J. K., Palese, P., Paulson, J. C., and Wllson, I. A. (2006).Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities, *Journal of Molecular Biology* **355**, 1143-1155. 由流感血细胞凝集素在特异连键中识别唾液酸的结构基础分析。

习 题

11.1 论述聚糖以不同方式参与细菌、病毒和寄生物引发疾病。

11.2 对弯曲杆菌中和真核生物中 N- 连接糖基化系统进行比较。在生产细菌药用糖蛋白中，为这一系统，预期会产生怎样的结果?

参考文献：Schwarz, F., Hunag, W. Li, C., Schulz, B.L., Lizak, C., Palumbo, A., Numao, S., Neri, D., Aebi, M., and Wang, L.-Xi (2010). A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation, *Nature*

Chemical Biology **6**, 264-266.

Szymanski, C.M., Logan, S.M., Linton, D., and Wren, B.W. (2003). Campylobacter-a tale of two protein glycosylation systems, Trends in Microbiology 11, 233-238.

11.3 对病原体糖结合受体相互作用的研究，如何提供设计抗菌药物靶标进行讨论。

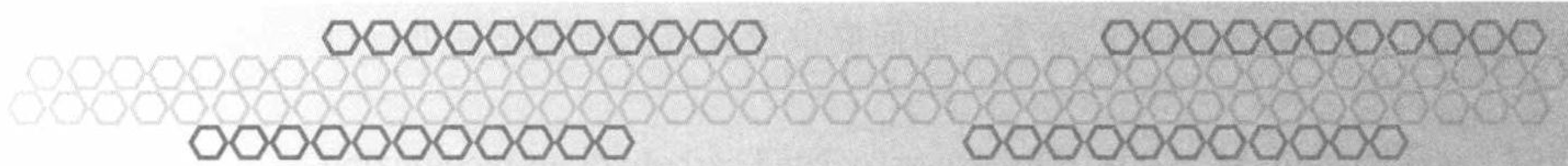
参考文献：von Itzstein, M. (2008). Disease-associated carbohydrate-recognizing proteins and structure-bassed inhibitor design, *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 558-566.

11.4 转基因植物作为产生重组糖蛋白的宿主，引人注意。论述为什么植物细胞产生的糖基化不适宜生产药用糖蛋白，采取什么措施可以解决这种问题。

参考文献：Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glossl, J., and Steinkellner, H. (2004). Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking batal, 2-linked xylose and core alphal, 3-linked fucose, *FEBS Letters* **561**, 132-136.

11.5 比较不同糖识别蛋白识别糖的分子机制。在讨论的蛋白质中包括动植物、细菌和病毒蛋白。

12 糖生物学与发育



学习目的

学习本章后应知内容

1. 蛋白聚糖调控生长因子活性的机理
2. 蛋白聚糖在脊椎动物和无脊椎动物发育作用中的基因证明
3. O- 岩藻糖如何调控发育早期的图式形成
4. 糖脂以多种方式调控神经系统发育
5. T 淋巴细胞中糖基化反应变化如何调控正负选择

我们基本上是通过观察编码糖基转移酶和聚糖结合受体的基因突变表型，汲取糖基化生物学功能方面的知识。事实上多数导致发育异常的这些突变，为多细胞生物在不同发育阶段糖基化的重要作用，提供了令人信服的证据。我们对有些案例的特殊基因如何变化已有全面的了解，在这一章中将讨论几个这方面的实际例子。另外，也要讨论一些具有广泛意义，但尚未完全了解清楚的突变影响。遗憾的是，在讨论这些例子时，我们的知识多为描述性的说明，而不是机械性的论述。除讨论聚糖在胚胎发育早期和动物机体计划形成中的作用外，在神经发育、免疫系统中，糖基化的功能也在考虑范围之内。

12.1 生化分析证实细胞表面蛋白聚糖如何作为生长因子的辅受体

哺乳动物系统的生化分析与果蝇的基因分析联合证实蛋白聚糖，特别含有硫酸乙酰肝素链的蛋白聚糖对发育具有多种功能。这些功能包括：

- 作为受体蛋白激酶刺激作用的辅受体；
- 生长因子在防止受体刺激中的隔离作用；
- 对生长因子和形态发生素梯度的输运和稳定作用。

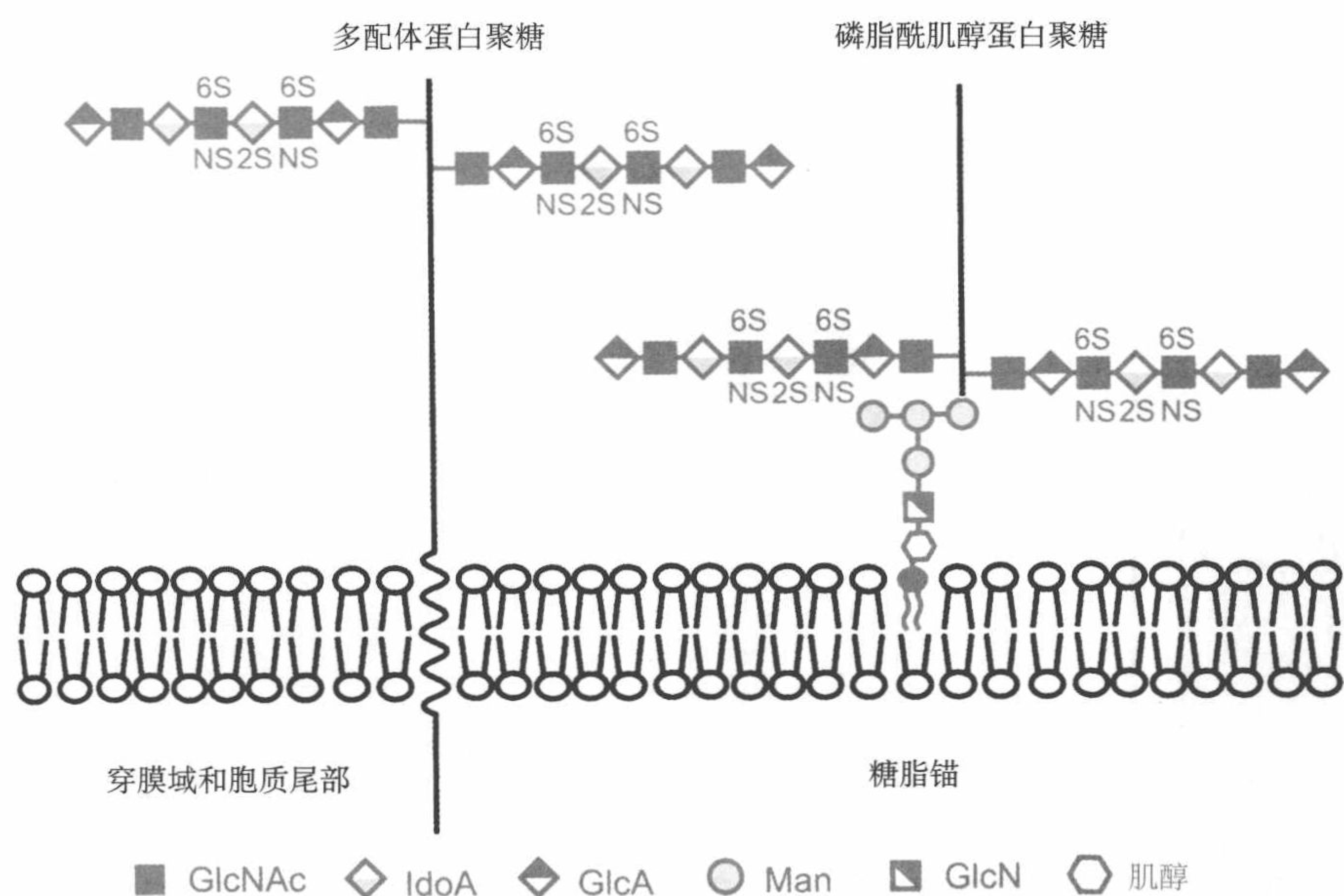


图 12.1 膜蛋白聚糖组织。多配体蛋白聚糖是含有数个糖胺聚糖结合位点的穿膜蛋白质。磷脂酰肌醇蛋白聚糖通过 C 端糖脂锚与基质膜结合，并载有与 C 端 50 个氨基酸连接的糖胺聚糖

其中有些功能由基质蛋白聚糖介导，另一些则由存在于质膜中的第二类重要蛋白聚糖介导（图 12.1）。这些核心蛋白质的胞外域，都载有一个或几个糖胺聚糖链。多配体蛋白聚糖（syndecan）情况下的糖胺聚糖，通过穿膜域锚固在膜上，而磷脂酰肌醇蛋白聚糖（glypican）的糖胺聚糖，则通过糖脂锚锚固于膜上。这些核心蛋白通常是与糖胺聚糖链缀合，但另一些作为兼职的蛋白聚糖，则以结合和未结合糖胺聚糖的两种形式存在。

➊有关基质蛋白聚糖参见 3.5 节。

通过成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）与多配体蛋白聚糖结合的肝素链，对信号传送是必不可少的（图 12.2）。蛋白聚糖作为生长因子必要的辅受体可以激活初生受体。初生受体的胞外域在末端免疫球蛋白型模件中含有结合生长因子的部位，胞内域具有酪氨酸激酶活性。生长因子与硫酸乙酰肝素和受体共结晶分析表明，硫酸乙酰肝素可能具有稳定三元复合体的机制。在两生长因子分子的模型中，每一生长因子与其受体亚基相互作用，并通过硫酸乙酰肝素使它们结合在一起。这些相互作用，加上硫酸乙酰肝素与受体亚基的相互作用，可以稳定二聚体形式的受

➊有关硫酸乙酰肝素合成参见 3.6 节。

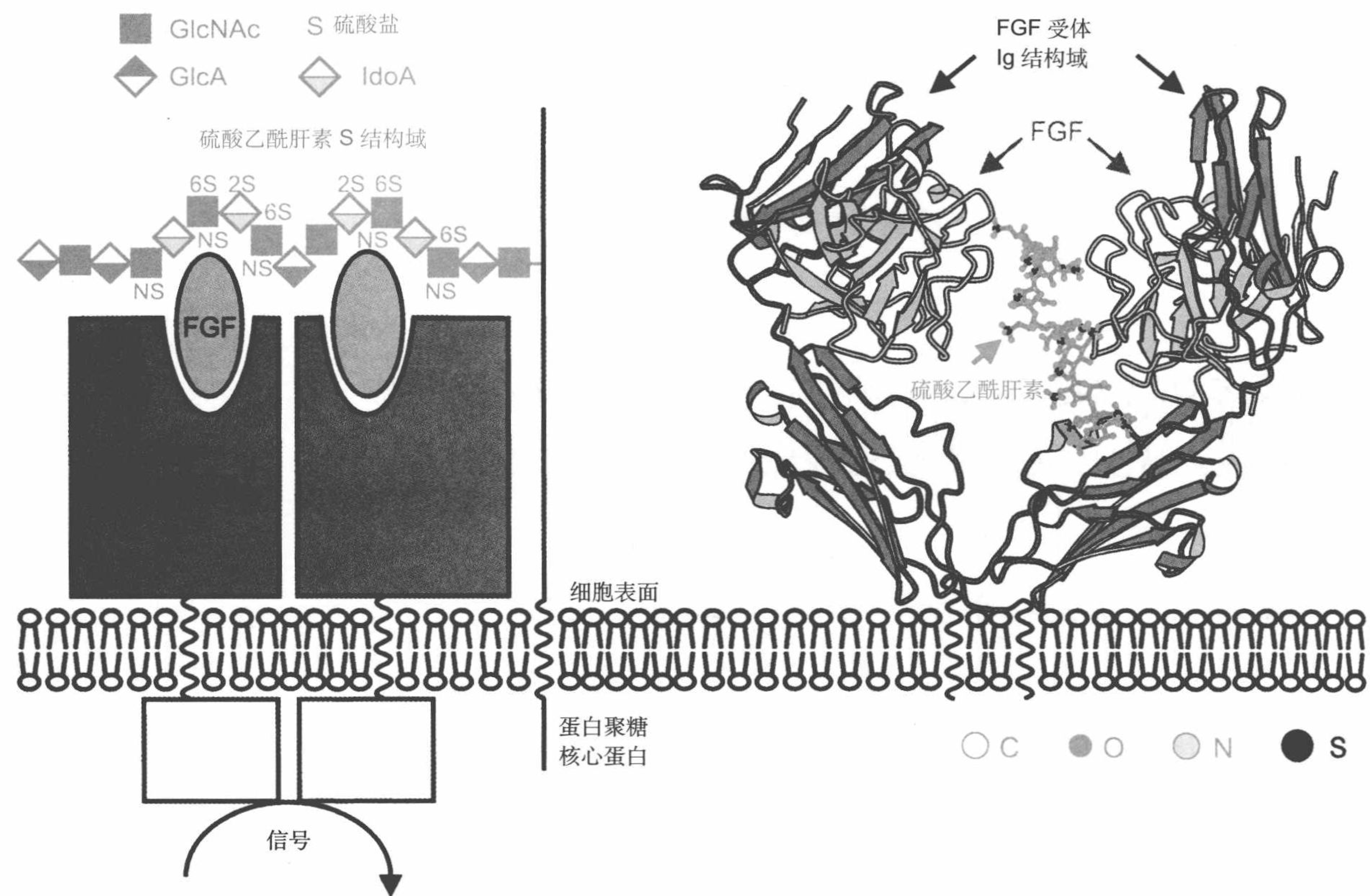


图 12.2　作为成纤维细胞生长因子（FGF）辅受体的细胞表面硫酸乙酰肝素的功能。信号传送需要受体——FGF 复合物的二聚体。二聚体复合物由硫酸乙酰肝素中硫酸化残基的特异性序列保持稳定。图中显示 X 射线晶体分析法所见复合体。[根据蛋白质数据库条目 1E0O] Ig, 免疫球蛋白。

➲有关肝素参见框 6.1。

体，导致产生胞内信号传送事件。

与生长因子相互作用的硫酸乙酰肝素链片段与其受体必须满足结构的特异性要求。在蛋白聚糖链的内部，经常出现簇聚的修饰区。硫酸乙酰肝素的这种修饰区，含有通过差向异构化作用从葡糖醛衍生艾杜糖醛酸残基和 N- 连接和 O- 连接硫酸残基。在不同组织和在不同发育时期，硫酸乙酰肝素修饰的不同格式，为生长因子的活性调控提供了可能的机制。但是，与肝素激活抗凝血酶要求专一性严格的糖修饰序列相比，硫酸乙酰肝素作为成纤维细胞生长因子家族许多成员辅受体的活性，主要是与整体电荷密度相关，并不单纯地取决于修饰。

另一些糖胺聚糖链与蛋白质的相互作用，对修饰格式的要求不同。例如，介导细胞与周围基质之间相互作用的纤连蛋白蛋白质，既可以结合细胞表面的整联蛋白，也可以结合蛋白聚糖受体。蛋白聚糖与糖胺聚糖链特异修饰部分的相互作用，再次发生在蛋白质表面正电荷凹槽内，表明两蛋白质通过正电荷排列区的适当结合，稳定蛋白质与蛋白质间的相互作用，可能是蛋白聚糖功能中常有的机制。

12.2 突变小鼠为哺乳动物发育中蛋白聚糖的功能作证

有关敲除小鼠和发育参见 5.8 节。

发育遗传分析方法之一是进行随机诱变和筛选不能正常发育的突变体。用这种方法鉴定的小鼠惰性中胚层突变就是因为蛋白聚糖合成所需的一种基因造成的，由此也为蛋白聚糖在发育的主要作用提供了证明。这一突变体基因，编码 UDP- 葡糖醛酸用于糖胺聚糖合成所需的 UDP- 葡萄糖脱氢酶（图 12.3）。正如“惰性中胚层”这一名称所表明的含义，在原肠胚形成期间，不能使中胚层迁移，而导致胚胎死亡。这一表型与小鼠中观察到的缺失成纤维细胞生长因子 8 的表型相类似，进一步的分析表明，是

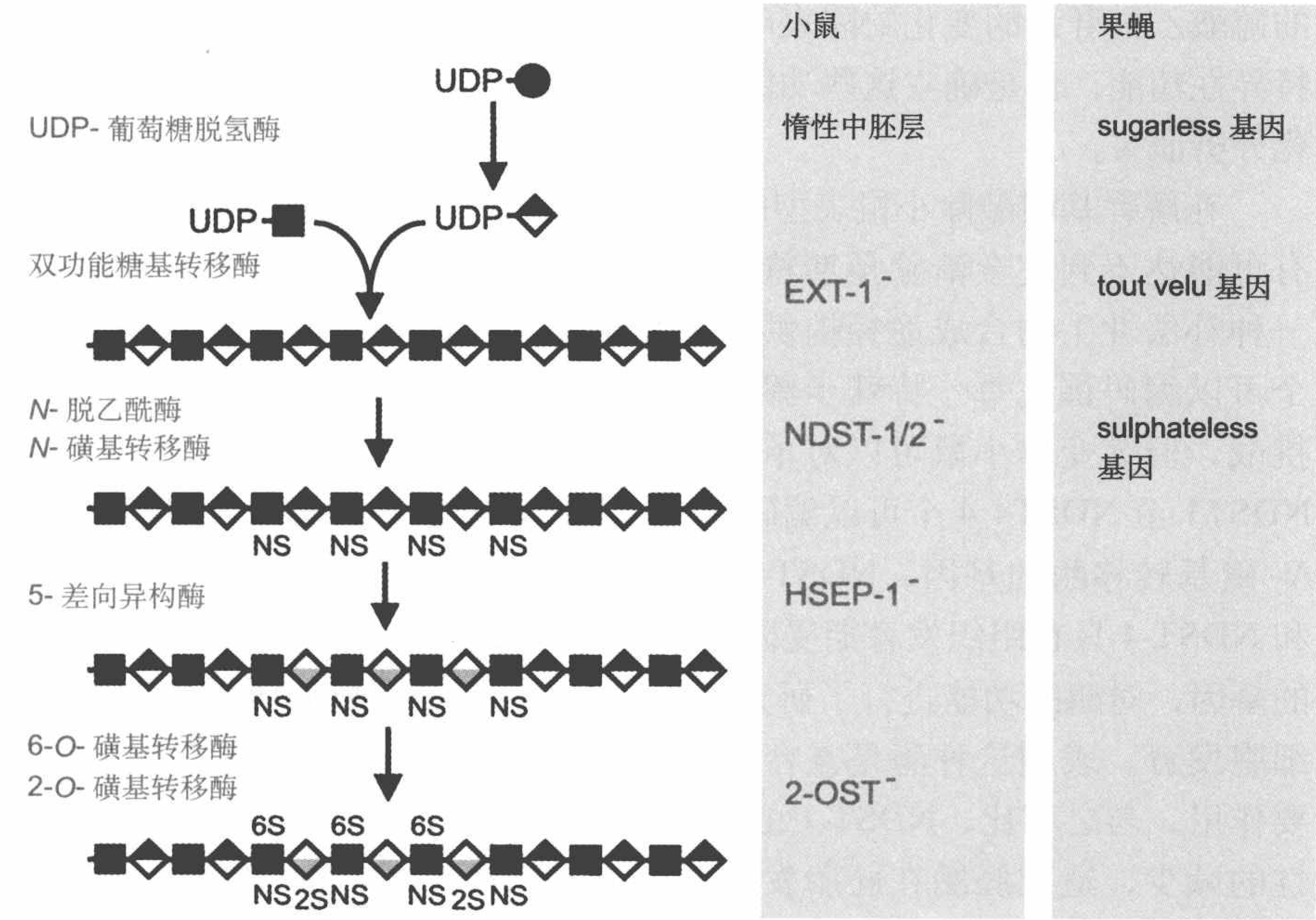


图 12.3 蛋白聚糖生物合成途径中的突变。图中表明了导致小鼠和果蝇发育缺陷的酶。黑色表示由随机诱变发生的突变，蓝色表示由基因敲除产生的突变

因为成纤维细胞生长因子信号传送失灵，导致细胞迁移缺陷。由此，这一突变为蛋白聚糖作为生长因子信号传送的辅因子功能提供了体内证明，并完善了生化和细胞生物学体外功能研究的不足。

制造筛选基因被破坏的小鼠，是另一检测聚糖功能的有效方法。通过敲除编码合成硫酸乙酰肝素重复二糖所需双功能糖基转移酶的基因，进一步获得了证实蛋白聚糖重要性的证据。缺失这一基因的小鼠不能承担原肠胚图式的形成，再一次表明，硫酸乙酰肝素在胚胎早期组织迁移中具有重要作用。对形成簇聚特异修饰糖残基所需的基因，相信也要与成纤维细胞生长因子以及与其靶向的受体结合。葡糖醛酸基 C5 差向异构酶和 2-*O*- 磺基转移酶各自由单一基因编码，因此，敲除这种单一基因，可用于防止这类修饰。由于这两种突变严重的发育异常，是致死性的突变，但是，这种小鼠与完全不能合成糖胺聚糖的小鼠相比，其发育期更长些。虽然差向异构酶对肾、肺和骨骼的正常发育是必不可少的，但敲除 2-*O*- 磺基转移酶，将导致肾脏缺失和眼睛、骨骼的畸形。尽管已经证明，在胚胎图式形成早期阶段需要多种硫酸乙酰肝素依赖型生长因子，但其他的器官系统发育正常。增加 2-*N*- 硫酸化和 6-*O*- 硫酸化对产生能与生长因子相互作用的硫酸乙酰肝素是有利的，这一情况与生物化学的证明相符合，这类相互作用与特定的修饰方式相比，更多的是与整体负电荷相关。只限于在小鼠中出现的硫酸乙酰肝素的变化缺陷表明，不同形式的硫酸乙酰肝素都有其各自的特异性功能，但是确立这些功能的界限或范围，还需要进一步的基因和生化分析证实。

在解释基因敲除小鼠表型时，应谨慎从事。在敲除筛选的转移酶时，有可能达不到完全清除预期特定聚糖的结果，在这种情况下，为发现另一种补偿性生物合成途径提供了重要路线。在聚糖生物合成中，当有多个可以编码催化每一特殊步骤的酶家族时，基因敲除研究会遇到特殊的挑战，但突变体小鼠可以对单个酶的功能提供关键性的信息。例如，有 NDST1 至 NDST4 4 个可以编码硫酸乙酰肝素生物合成所需 *N*- 脱乙酰酶 / *N*- 磺基转移酶的基因。NDST-1 和 NDST-2 可以广泛地表达，而 NDST-3 和 NDST-4 只在组织发育期受限制的表达。通过分别敲除这两个广泛表达的基因，对酶的功能进行了研究，敲除 NDST-2 最明显的效果是阻止肥大细胞发育，表明这种酶是在合成高度硫酸化肝素的肥大细胞颗粒中起主要作用。与之相比，NDST-1 的敲除则导致胚胎中硫酸乙酰肝素数量实质性的减少，造成胚胎在胚胎发生后期死亡，或在刚出生后夭折。尽管在这些小鼠中硫酸乙酰肝素补体有重要改变，再一次说明，基础的胚胎图式形成和器官形成仍继续进行。但是，缺失 NDST-1 和 NDST-2 的双敲除

小鼠与完全不能生成肝素聚合体小鼠的情况相似，因为它们都不能正常地形成原肠胚。因此，虽然 NDST-1 和 NDST -2 在不同发育阶段和不同部位正常地修饰肝素，只要两种酶中有任何一种存在，就可以使发育期延续至出生。

12.3 果蝇和其他模式生物的研究表明硫酸乙酰肝素蛋白聚糖多方面功能

我们对哺乳动物生物化学各方面的知识多受益于模式生物的研究。分析模式生物中的聚糖和结合聚糖的蛋白质表明这种方法适合于研究聚糖的功能。发育生物学家已经对果蝇、大肠杆菌、秀丽新小杆线虫、非洲爪蟾和斑马鱼等无脊椎动物和简单的脊椎动物进行了深入地研究，这些模式生物为聚糖能行使的功能提供了典型实例。在模式生物和哺乳动物之间可以直接比较聚糖的某些功能，在这种情况下，简单生物基因的易加工性成为研究聚糖功能的强有力的生物体系。

果蝇发育异常突变体的筛选曾用于鉴定参与蛋白聚糖生物合成中的几个基因突变体，表明蛋白聚糖对脊椎动物和无脊椎动物的发育具有非常重要的作用。采用这种筛选方式鉴定的基因，包括编码蛋白聚糖核心蛋白质和合成硫酸乙酰肝素需用酶的基因（图 12.3）。例如，编码果蝇磷脂酰肌醇蛋白聚糖之一的 *dally-like* 突变基因，或导致胚胎发生和 dally 突变中不能正确导向轴突的多配体蛋白聚糖基因，和破坏多种组织形态发生的另一果蝇磷脂酰肌醇蛋白聚糖基因。基因研究表明产生这类影响的原因是突变形式的 Dally 不能与 Wnt 家族成员 Wingless 生长因子和 β 转化生长因子 / 骨形态发生蛋白质家族成员、十五褶基因（Decapentaplegic）产生的蛋白质相互作用 。与成纤维细胞生长因子相比，虽然对这类生长因子相互作用的性能还知之甚少，这两种生长因子都是结合硫酸乙酰肝素的蛋白质。

蛋白聚糖硫酸乙酰肝素部分的重要性，可以直接从基因 *sugarless* 突变中破坏 Wingless 信号传送过程得到证明，这种 *sugarless* 基因突变类似于小鼠惰性中胚层突变，并导致不能合成 UDP- 葡糖醛酸，从而损害生成糖胺聚糖链的能力。因编码生成聚合体主链双功能糖基转移酶的 *tout velu* 基因突变和只编码果蝇中肝素 *N*- 脱乙酰酶 /*N*- 磺基转移酶 *sulphateless* 基因的突变，造成硫酸乙酰肝素合成减少，也能破坏 Wingless 信号传送。

蛋白聚糖生物合成突变的一些影响，可能是因为在成纤维细胞生长因子、Wnt 以及骨形态发生蛋白质家族中，需要正确地呈献硫酸乙酰肝素链作为生长因子的辅受体产生的结果，但是通过对细胞表面硫酸酯酶作用的研究证实，有些表型显示蛋白聚糖还有其他功能。这些酶可以从硫酸乙酰肝素清除硫酸基，并能调控其活性。例如，Sulf1 和 Sulf2 酶可以选择性地裂解 6-*O*- 硫酸连键。非洲爪蟾细胞表面硫酸乙酰肝素的 Sulf1 具有抑制内源性硫酸乙酰肝素辅受体的作用，可能因为需要 6-*O*- 硫酸基团与成纤维细胞生长因子受体相互作用，虽然与结合成纤维细胞生长因子结合自身并无影响。但是，同样的酶可以刺激 Wnt 蛋白与其卷曲受体相互作用。这种情况表明，硫酸残基的清除，降低了硫酸乙酰肝素对 Wnt 蛋白的亲和力，使其能够移动至受体并激活受体（图 12.4）。

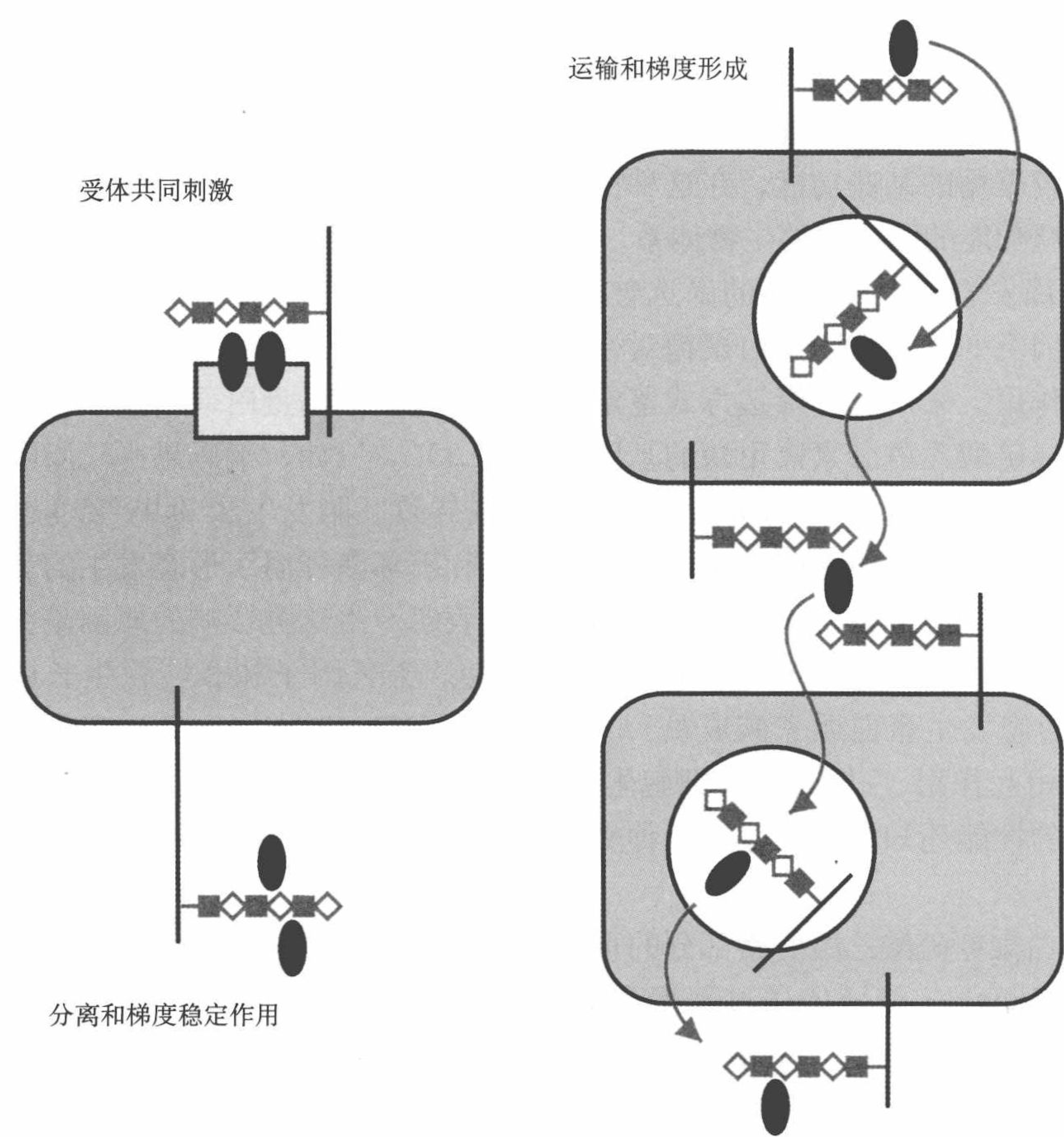


图 12.4 蛋白聚糖与生长因子另一相互作用机制。生长因子以黑色椭圆符号表示，糖胺聚糖以蓝色符号表示

多数生长因子为碱性，在细胞表面和胞外基质蛋白聚糖糖胺聚糖链上黏附，成为观察到的分离型 Wnt 蛋白。通过防止扩散和与蛋白聚糖的相互作用可以稳定生长因子的浓度梯度，也可以增加其局部浓度。硫酸酯酶可以提供有关生长因子释放和启动细胞膜受体激活的机制。这样的配置有其重要性，因为与到处移动的激素不同，本体生长因子只在较短距离发挥作用。Sulf1 和 Sulf2 酶还可以通过同样的移动机制增强癌细胞中 Wnt 的信号传送，为了刺激创伤治疗部位，也可能需要释放生长因子。

果蝇 *tout velu* 基因中的突变表型，表明蛋白聚糖在调控生长因子分布上也具有某种作用。这些突变破坏了由刺猬蛋白质控制的图式形成。虽然刺猬蛋白质是分泌性蛋白，而且细胞也可以应答，但生长因子不能从合成它的细胞中迁出，因此它立即刺激邻近的细胞，但不能刺激 10 个细胞半径以内的其他细胞。据信，刺猬蛋白质与蛋白聚糖上硫酸乙酰肝素结合，并且通过细胞被输运至邻近的细胞。刺猬蛋白质与蛋白聚糖的这种相互作用，可以增强和限制生长因子的移动性。

虽然有一些保守的聚糖功能例子，但多数无脊椎动物和脊椎动物的聚糖和结合聚糖的受体实际上都有很大不同。在某些生物中出现的聚糖，可能已经进化到能行使特殊功能。例如，出现在无脊椎动物中，但在脊椎动物中未出现的核心 α1-3 连接的岩藻糖型残基，与这一结构的特异性受体一起都在果蝇脑发育中检测出来，表明岩藻糖基化的聚糖与受体间的相互作用有助于神经系统中的组织发育。由于哺乳动物缺少了这种岩藻糖基化的聚糖，这种果蝇受体不能成为哺乳动物专一性受体的良好模型。

框 12.1 疾病糖生物学：**蛋白聚糖生物合成异常引发的人患疾病**

这一章讨论的小鼠和果蝇的几个人的同源基因突变已在发育异常的患者中得到证实。尽管蛋白聚糖基因在很多物种中与发育缺陷有关，有意思的是发现与同源基因突变相关的表型则有很大区别。对人发育失常与糖基化变化相关的研究，已成为聚糖功能信息的重要来源，也是对小鼠和其他模式生物研究的重要补充。

扭曲性骨发育不良（扭曲的发育异常）是侏儒症的一种形式，一种软骨生物合成的失常症。硫酸基团运输失常是导致基质蛋白聚糖硫酸化过低的重要原因。这种病的严重性是由 *DTDST* 基因编码的扭曲性骨发育不良硫酸转运体的完全丧失引起的。导致中等运输水平的错义突变与轻度症状相关。细胞表面蛋白聚糖硫酸乙酰肝素的硫酸化程度降低，很可能像在果蝇中 *sulphateless* 基因突变一样，导致生长因子活性降低。但是，缺陷软骨的形成多数情况是因为基质蛋白聚糖，如聚集蛋白聚糖（aggrecan）硫酸化的丧失。即使 *DTDST* 基因中的纯合性失效突变也不会导致各类细胞中完全丧失硫酸基输运，因此，硫酸基转运的减少，可能不会影响细胞表面的蛋白聚糖。

这种多发性遗传外生骨疣症，能引发骨生长板上良性肿瘤的发育。与这种病相关的两种 *EXT* 基因编码合成硫酸乙酰肝素重复二糖的双功能聚合酶，和引发聚合酶功能丧失导致发病的突变。通过与果蝇 tout velu 突变体类比，预计肿瘤发育可能由于细胞表面蛋白聚糖硫酸乙酰肝素的水平降低，破坏了生长因子活性引起的。但是，不能这样简单地推论，因为这种病的表型表明，当缺乏适当的硫酸乙酰肝素合成时，生长因子的活性增加而不是降低。

与果蝇具有的两种磷脂酰肌醇蛋白聚糖相比，有 6 种不同的人磷脂酰肌醇蛋白聚糖。人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 的突变是 Simpson-Golabi-Behmel 综合征的致病原因，特征表现是各种组织过度生长和具有肿瘤形成易感性。根据果蝇磷脂酰肌醇 -3 基因突变的推断，这种综合征说明了磷脂酰肌醇蛋白聚糖 -3 对生长因子起作用，但是对表型的分子基础原理还有待给出解释。就 *EXT* 基因而言，人的基因突变似乎是提高生长因子的活性，而不是使活性降低。

论述题

• 对比编码硫酸乙酰肝素核心糖胺聚糖链合成酶对果蝇、小鼠和人基因突变的影响。

• 讨论磷脂酰肌醇蛋白聚糖在激活 Wnt 家族成员中可能的作用。

主要文献

• Karniski, L.P. (2004). Functional expression and cellular distribution of diastrophic dysplasiasulphate transporter (DTDST) gene mutations in HEK cells, *Human Molecular Genetics* **13**, 2165-2171.

• Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2008). Heparan sulphate biosynthesis and disease, *Journal of Biochemistry* (*Tokyo*) **144**, 7-14.

• Song, H.H., Shi, W., Xiang, Y.-Y., and Filmus, J. (2005). The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2116-2125.

12.4 O- 连接岩藻糖基聚糖对脊椎和无脊椎动物发育过程中的胞外信号传送具有非常重要的作用

在脊椎和无脊椎动物组织的图式发育中，直接与丝氨酸或苏氨酸结合的岩藻糖具有重要作用。已经对果蝇细胞表面刻缺蛋白受体（Notch receptor）的这种修饰进行了深入地研究。果蝇刻缺蛋白包含两个亚基，一个胞外亚基和一个胞内穿膜亚基。当刻缺蛋白胞质结构域受到邻近细胞表面适当配体相互作用的刺激时，刻缺蛋白胞质结构域被切割，释放出一种转运至细胞核和启动基因转录程序的肽。

刻缺蛋白控制的基因表达发生在位于翅翼发育中线处的细胞。虽然刻缺蛋白自始至终在翅翼成虫盘中，即在将要形成翅翼细胞组中表达，但是通过背腹区界面之间刻缺蛋白选择性的激活才能形成中线细胞清晰的分界线。激活反应产生于中线侧面结构域中与不同受体的相互作用（图12.5）。有两种不同的配体可以激活刻缺蛋白：一种是在腹区表达的Delta配体和另一与*fringe*基因产物在背区一同表达的锯齿蛋白（Serrate）配体和边缘蛋白（Fringe）有区别地调制刻缺蛋白与两种配体相互作用的活性。在腹区，单独表达的Notch对Delta无应答，在背区与Fringe共同表达的Notch，对Serrate配体无应答。但是，在中线表达Notch和Fringe的来自背部一侧的细胞与来自腹部一侧的Delta相遇，导致Notch激活，反之，只表达Notch的腹部细胞与表达Serrate的背部细胞相遇，也导致Notch激活。

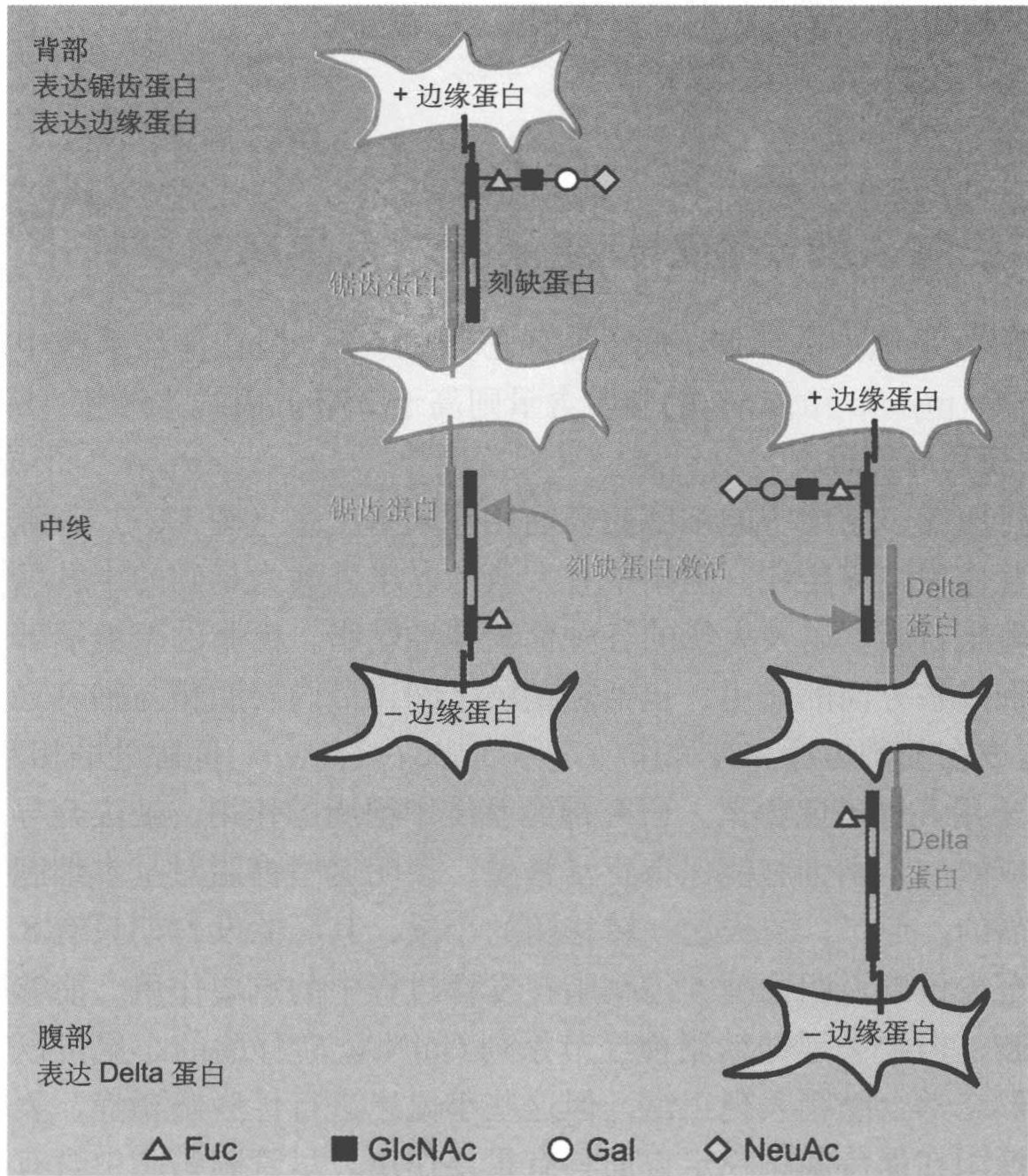


图 12.5 由边缘蛋白（Fringe）糖基转移酶修饰刻缺蛋白（Notch）配体结合活性产生中线信号传送区的释义。来自刻缺蛋白应答不同配体的信号取决于其糖基化的状态

Notch 对 Delta 和 Serrate 应答中的变化是由 Fringe 修饰 Notch 上 O-连接聚糖活性引起的。Notch 的胞外部分由 36 个表皮生长因子样模件组成（图 12.6）。在多数这些模件中，有一针对岩藻糖与特异苏氨酸或丝氨酸残基结合的序列模体。这些岩藻糖残基的出现是刻缺蛋白接近细胞表面所需要的。*Fringe* 基因编码一种 GlcNAc 转移酶，启动这些岩藻糖残基与 GlcNAc、半乳糖和唾液酸残基继续进行复杂反应，这些复杂反应的出现将改变刻缺蛋白与两配体相互作用的应答。另一些独特的 O- 连接葡萄糖残基的出现，也是刻缺蛋白行使功能所需要的。由聚糖修饰刻缺蛋白与配体相互作用的分子机制还不甚清楚，但至少有一边缘蛋白依赖性聚糖与位于和配体相互作用刻缺蛋白部分中的表皮生长因子结构域 12 结合（图 12.6）。这一变化表现，对与聚糖结构变化相关的蛋白质功能最具专一性影响。参与脊椎动物早期胚胎图式形成同源刻缺蛋白类似的修饰表明，这些聚糖的作用始终保留在整个动物界。

12.5 细胞表面糖脂对神经系统发育具有重要作用

大部分组织中的糖脂，低于脂质总量的 5%，但在神经系统中，隔离轴突髓鞘（myelin sheath）的脂质含量则高于 25%。由施万细胞（Schwann cell）质膜和环绕轴突重复包裹少突胶质细胞（oligodendrocyte）形成髓鞘。膜层进行压缩，压缩中的细胞质表面相互紧密压实（图 12.7）。胞外膜表面的相互作用结束压缩。髓鞘中有大量的以半乳糖为基础的半乳糖苷基脑酰胺和硫脑苷脂，以及大量的各种葡糖神经鞘脂。糖脂的聚糖端部基团介导髓鞘形成各方面的作用，包括髓鞘层之间，最内层髓鞘与轴突之间的相互作用，或在髓鞘边缘和被称作郎飞结(node of Ranvier)间隙处的相互作用。

曾采用几种敲除小鼠，研究神经系统中糖脂的作用。缺失介导葡糖脑酰胺合成酶的个别细胞能保持正常繁殖，表明这些糖脂对基本细胞生理学不是必需的。但是，缺失这一转移酶的小鼠，其胚胎发育期只有 8 天，这种情况至少可以说明葡糖神经鞘脂在发育过程中的重要作用。能够生成葡糖脑酰胺，但缺失延伸糖脂神经节系列 GalNAc 转移酶的小鼠可以存活。尽管在形态学上髓鞘表现正常，但这些小鼠患进行性脱髓鞘症，表明这一复合性糖脂在保持髓鞘稳定方面具有重要作用。尽管髓鞘脂中含有丰富的半乳糖鞘糖脂，但缺失启动半乳糖鞘糖脂半乳糖基转移酶的敲除小鼠仍能生成髓鞘。这些小鼠脑中额外合成的葡糖基脑酰胺起弥补失掉半乳糖苷基

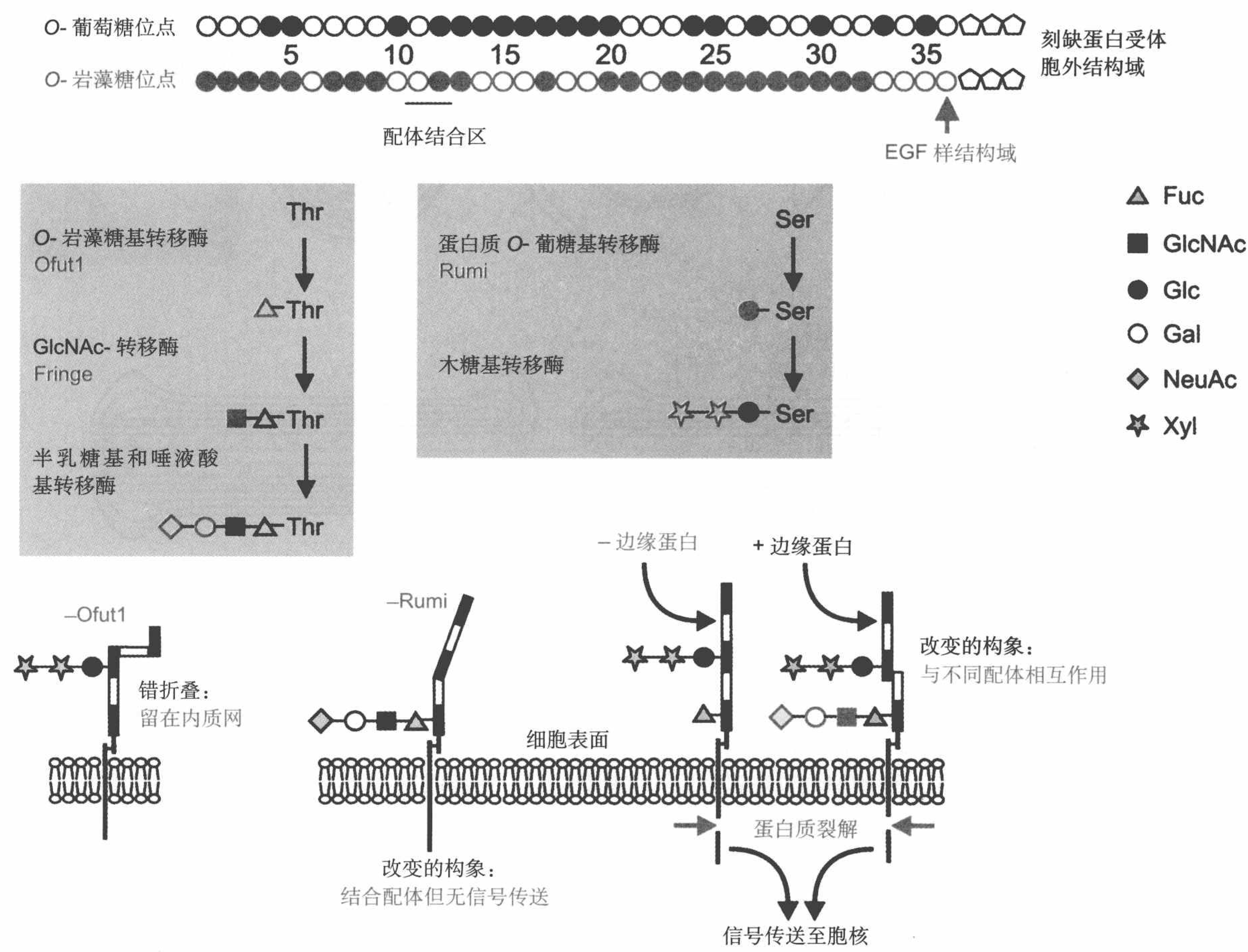


图 12.6 糖基转移酶对刻缺蛋白行为的修饰。通过 O- 岩藻糖基转移酶 1 在表皮生长因子（EGF）结构域添加岩藻糖残基对刻缺蛋白正确折叠和移出内质网（ER）是必要的。对刻缺蛋白能够具有介导细胞间信号传送的构象，再添加木糖残基之后，还需要 Rumi 葡糖基糖基化。岩藻糖残基可以通过添加 GlcNAc 残基继续延伸的 Fringe 进行延伸。这一延伸聚糖的出现可以改变刻缺蛋白与不同配体的相互作用

脑酰胺和硫苷脂的作用，使髓鞘在形态学上的形象表现正常。但是，这些小鼠还会有神经缺陷，说明髓鞘并未充分发挥作用。

对缺失半乳糖苷基脑酰胺糖脂或大分子葡糖基脑酰胺脂质小鼠髓鞘的形成研究结果表明，成髓过程中起关键作用的是糖脂端部基团的一般性物理性质，而不是这些端部基团内任何专一性的糖序列。这些端部基团可能有助于使脂双层之间保持适当的间距。髓鞘的这种功能可能代表糖脂端部基团在动物细胞表面周围建立一般性糖屏障网络作用的一种特殊形式。对

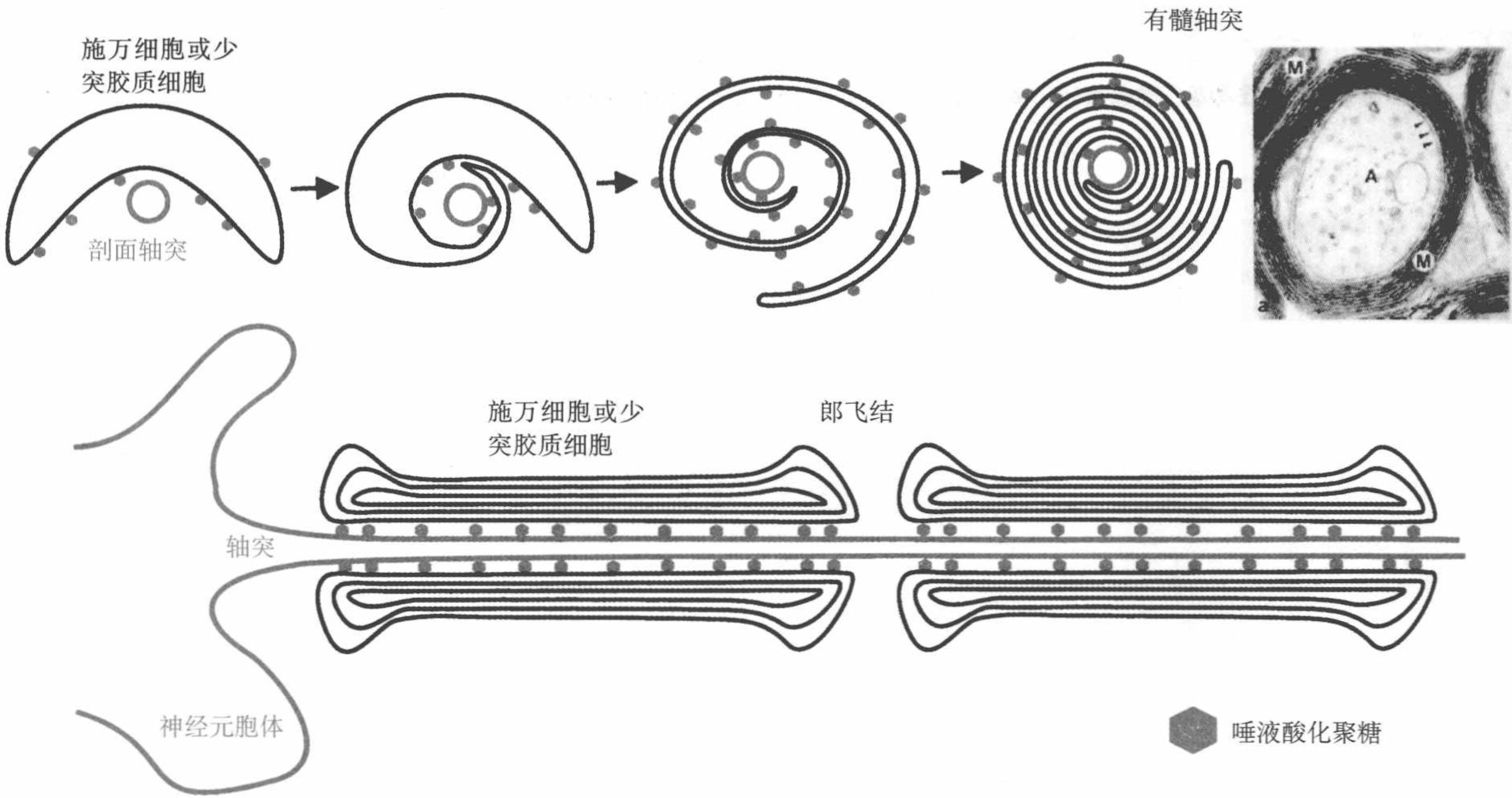


图 12.7　由外周神经系统施万细胞和中枢神经系统少突胶质细胞形成的髓鞘。图中显示从成髓细胞包被到形成盘绕轴突的另一层脂双层膜的过程。[髓鞘脂电镜图像，经许可，从下列文献复制：Schachner, M. and Bartsch, U. （2000）. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG （siglec-4a） in formation and maintenance of myelin, Glia **29**, 154-165. 糖脂的聚糖部分以六角形表示。] A. 轴突；M. 髓鞘质

●有关糖基化对蛋白质结构和稳定性影响参见第 8 章。

细胞膜物理性能产生的调制作用类似于糖基化对蛋白质结构和稳定性的直接影响。

鞘糖脂的多样性，结合上其在神经组织中的广泛分布，表明鞘糖脂可以在神经组织细胞之间多数识别过程中成为潜在的具有重要作用的特异性识别标志。某些抗特定糖脂表位的抗体可以选择性地染色特异性神经元群，在这种情况下，这些细胞与其相邻细胞间的相互作用，如在轴突导向过程中的作用，是始终保持一致的。相邻细胞上或胞外基质中的凝集素能与这类末端结构结合。其中对稳定髓鞘具有重要作用的髓鞘相关蛋白，将在本章下一节中讨论。但是，这种已知的受体数目与出现在糖脂上的聚糖数目并不相符，因此，糖脂的标志与受体不是一一对应的。与此观点相反的是，每一不同糖脂的头部基团可能介导不同功能。另一极端观点认为，像各类神经节苷脂这样的糖缀合物，对具有不同作用的神经系统是必不可少的，

而对某个聚糖不具有不同作用。当创制出缺失特异性糖脂亚组的小鼠，并对其表型进行详细研究后，在这两种极端观点间可能得出这样的答案：某些特异性糖脂可以介导特定的识别事件，但对整体糖脂而言，多数情况下具有重叠和完全相同的功能。

糖脂在发育中的重要作用从下列事实可以得到进一步的证实，虽然已经知道因糖脂裂解酶一般缺陷引发几种人患疾病，但查明的只有一种是由糖脂合成失常引发的人类遗传性疾病，可能因为糖脂合成缺陷对胚胎发生大多是致死性的。由于对乳糖基脑酰胺添加唾液酸形成神经节苷脂 GM3 的唾液酰基转移酶（LacCerα2-3 唾液酰基转移酶或唾液酰基转移酶 9）的基因突变引发的一种神经节苷脂生物合成缺陷，已成为古老的阿米什（Old Amish）家族的特征。这种位于两唾液酸模体区域的无义突变，导致生成无功能性蛋白质。GM3 的形成是合成最复杂神经节苷脂的第一步，LacCerα2-3 唾液酰基转移酶缺陷不仅影响 GM3 的合成，也影响很多其他神经节苷脂的合成。从个体患者的基质和成纤维细胞的生化分析结果中发现，这些患者几乎完全丧失 GM3 和由 GM3 正常合成的其他神经节苷脂。对这一突变基因为纯合性的儿童，在其出生后第一年显示癫痫症，并出现严重的发育缺陷。这种人类疾病突显对大脑发育正常神经节苷脂生物合成的重要性，但只对糖脂在发育中的确切功能提供了有限的信息。

糖生物学与疾病 **糖脂合成与早发癫痫症**

有关糖脂贮积症参见 4.5 节。

有关唾液酸基转移酶参见 5.1 节。

12.6 髓鞘相关糖蛋白对中枢和外周神经系统发育具有重要作用

与免疫系统细胞上出现的所有涎免凝素不同，髓鞘相关糖蛋白（MAG）是在形成髓鞘脂的施万细胞和少突胶质细胞表面神经系统中表达。有两种不同剪接方式的 MAG：一种是胞质长尾（L-MAG）；另一种是胞质短尾（S-MAG）。L-MAG 的功能是在中枢神经系统起始髓鞘形成，与之相比，S-MAG 则通过稳定轴突 - 髓鞘间的相互作用和抑制神经突生长，维护成熟的外周神经系统。所有这些作用都与末端结构域的唾液酸结合活性有关。MAG 与唾液酸黏着蛋白一样，可以与含有 α2-3 连键 NeuAc 的半乳糖配体结合。但是 MAG 具有很强的选择配体的能力，不与含有 α2-6 连键 NeuAc 的聚糖结合。另外，有证据表明，MAG 的结合部位比唾液酸黏着蛋白的结合部位延伸的更长。MAG 与载有末端唾液酸残基和沿残基具有唾液酸或硫酸取代基形式的负电荷复合糖脂可以很好地结合（图 12.8）。

有关涎免凝素参见 9.9 节和 9.10 节。

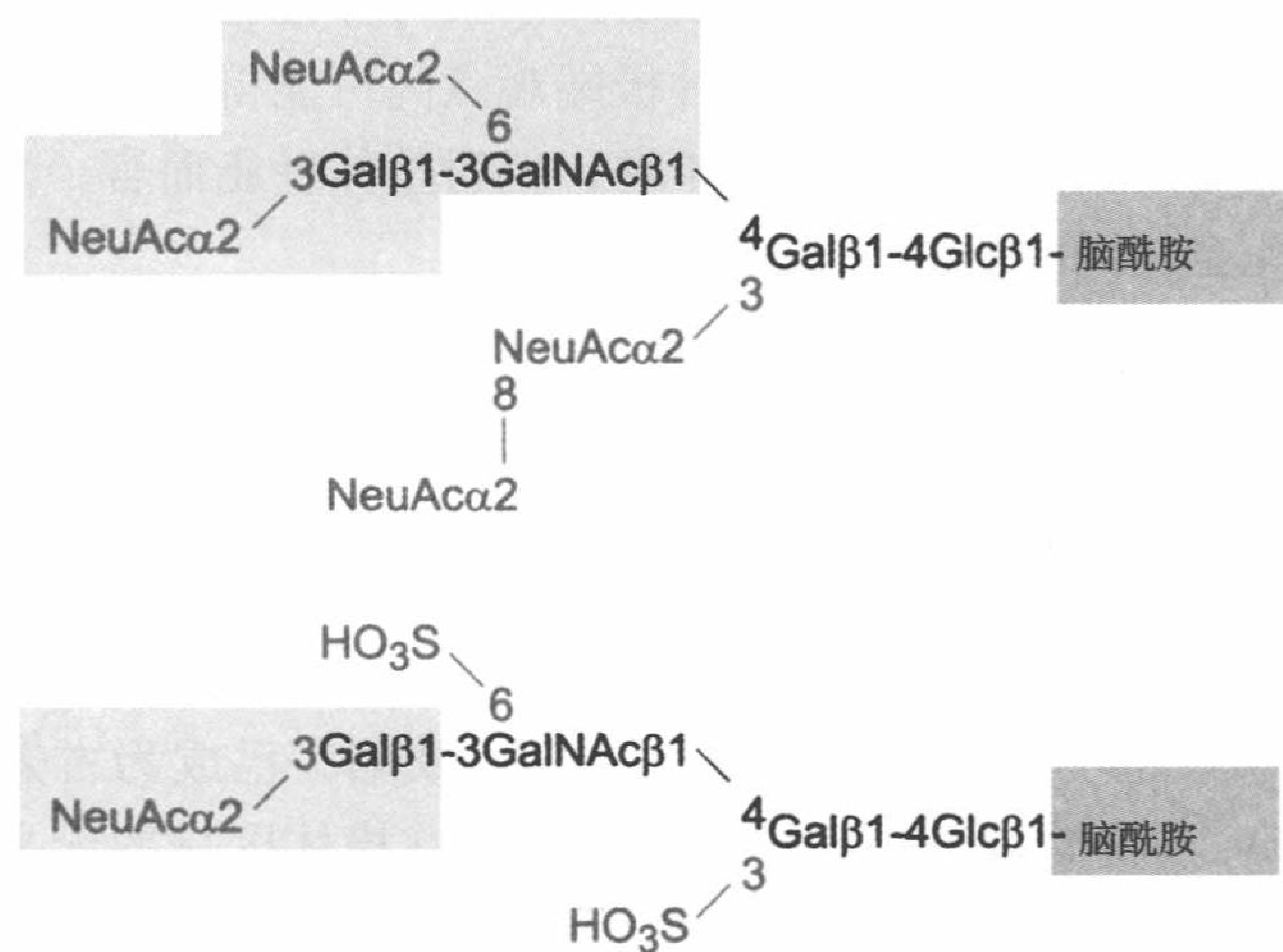


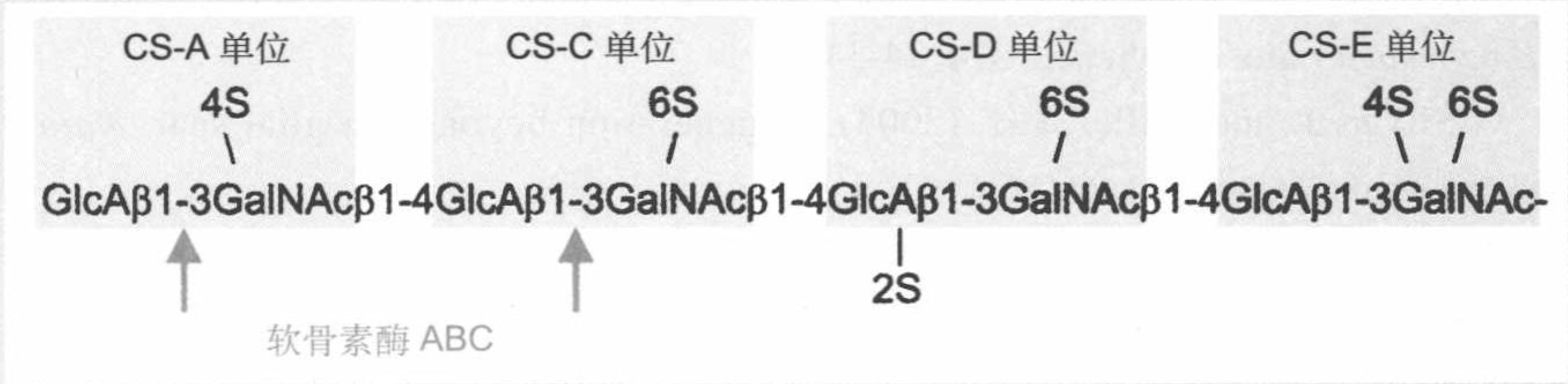
图 12.8 对髓鞘相关糖蛋白（MAG）的糖脂配体。载有多个唾液酸残基和硫酸基团形式负电荷的神经节苷脂（唾液酸化鞘糖脂）影响 MAG 的功能

尚未确定 MAG 有无天然配体，但是 MAG 能和糖蛋白和糖脂结合。体外实验证实，复合型糖脂与轴突周围髓鞘中存在的 NAG 高亲和力的结合与髓鞘的形成和稳定作用是一致的。缺失 MAG 敲除小鼠的外周神经系统显示髓鞘形成水平下降。在这些小鼠中枢神经系统中的髓鞘形成过程好像很正常，但是，当它们变老时，轴突和髓鞘深层之间的相互作用出现退化。在轴突和髓鞘之间产生的分离，将导致神经病学缺陷。缺失 MAG 敲除小鼠的表型，与生成延伸神经节苷脂所需 GalNAc 转移酶被删去小鼠表型非常相似，表明 MAG 与神经节苷脂的相互作用对髓鞘的稳定作用非常重要。只表达 S-MAG 的小鼠，显示中枢神经系统缺陷，但对外周神经系统没有影响。由 MAG 介导的对神经突生长物的抑制作用可能是神经系统恢复无效的重要原因。在神经系统遭受损伤的情况下克服这一抑制作用，在临床上具有重要意义。利用在含有 MAG 髓鞘质上培养的大鼠小脑神经元的体外分析表明，含有紧密结合 MAG、NeuAcα2-3Galβ1-3（NeuAcα2-6）GalNAc- 和 NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-（图 12.8）聚糖的合成糖苷类化合物，能够增强神经元的生长。这些聚糖最终可能与唾液酸酶和软骨素酶（参见框 12.2）一同作为医疗药物用于救治神经系统的预后再生。

框 12.2 糖治疗药物：*软骨素酶和唾液酸酶疗法有助于中枢神经系统神经元的再生*

哺乳动物中枢神经系统的神经元损伤后不能再生。损伤后的脊髓不能再生是造成终身瘫痪的主要原因。外周神经系统中运动和感觉连接损伤后可以重新建立，说明如果能够鉴定出抑制因子并使其无效，也可能使中枢神经系统的运动和感觉连接恢复再生。含有 MAG 成分的髓鞘脂可以中断抑制因子的来源。MAG 对轴突再生的抑制活性取决于其与唾液酸化神经节苷脂配体的相互作用（参见 12.6 节），已经说明了破坏掉这种配体就可以解除生长的抑制作用。在动物模型中测试这种疗法的效果发现，在脊髓挫伤部位注射细菌唾液酸酶，可以刺激轴突生长，恢复脊髓功能。

在大脑胞外基质中，含硫酸软骨素的蛋白聚糖是另外一种神经生长抑制剂。对培养神经元的研究表明，当轴突与硫酸软骨接触时，可能改变轴突的生长方向。虽然基质在其他区域对轴突生长和导向具有促进作用，但在胚胎特定区域硫酸软骨素的产生，据信对特定区域轴突的延伸可能形成屏障。成熟的胞外基质是大型的抑制性网络结构。



大脑中，包括聚集蛋白聚糖和一相关蛋白质家族（参见第 3 章）在内的多种基质蛋白聚糖都载有硫酸软骨素链。和硫酸乙酰肝素一样，硫酸软骨素在生物合成过程进行修饰，并含有不同程度的硫酸化区域，和由富含硫酸基 CS-D 和 CS-E 单位的组成区域。硫酸化程度不同的硫酸软骨素片段，对培养的轴突生长具有不同的刺激性或抑制性作用。以硫酸乙酰肝素与硫酸软骨素作类比，特定形式的硫酸软骨素，可能启动或修饰细胞信号传送事件，虽然涉及的启动或修饰途径以及对软骨素硫酸化的特殊要求尚无具体规定。但在任何情况下，不同星形胶质细胞系抑制轴突生长的活性与其所表达某些硫酸软骨素蛋白聚糖的数量有关。另外，星形胶质细胞的积聚和脊髓损伤部位形成的、被称为神经胶质细胞瘢痕的蛋白聚糖，由于核心蛋白质的额外合成和硫酸软骨素上硫酸基的增加，使抑制性蛋白聚糖更加充实。这种胶质细胞瘢痕阻止损伤区域中轴突的再生。

硫酸软骨素作为轴突延伸抑制剂的作用表明，降低损伤部位蛋白聚糖的水平就可以消除抑制作用。由于抑制作用是通过糖胺聚糖链介导的，曾利用降解硫酸软骨素的酶研究作为潜在的治疗药物。细菌软骨素酶可以降解出现在硫酸软骨素链中的几种连键。经过培养细胞中的测试，经软骨素酶治疗后证实，可以促进含有硫酸软骨素基质上的神经生长。临床前的实验中，在脊髓刀伤和神经压缩损伤部位注射后，对软骨素酶体内疗效进行了研究，在强化神经再生，导致靶组织功能性神经重新支

配方面取得了令人鼓舞的成绩。

论述题

- 描述脑中出现的蛋白聚糖家族。
- 论述硫酸软骨素调节中枢神经系统中轴突生长的证明。

主要文献

- Bradbury, E.J., Moon, L.D.F., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., and McMahon, S.B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury, *Nature* **416**, 636-640.
- Caggiano, A.O., Zimber, M.P., Ganguly, A., Blight, A.R., and Gruskin, E.A. (2005). Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function follwing contusion injury of the rat spinal columm, *Journal of Neurotrauma* **22**, 226-239.
- Mountney, A., Zahner, M.R., Lorenzini, 1., Oudega, M.R., Schramm, L.P., and Schnaar, R.L. (2006). Sialidase enhances recovery form spinal cord contusion injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **107**, 11561-11566.
- Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S., and Aono, S. (2000). Molecular interactions of neuronal chondroitin sulfate proteoglycans in brain development, *Archives of Biochemistry and Biophysice*. **374**, 24-34.
- Silver, J. and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar, *Nature Reviews Neuroscience* **5**, 146-156.
- Mountney, A., Zahner, M.R., Lorenzini, I., Oudega, M.R., Schramm, L.P., and Schnaar, R.L. (2006). Sialidase enhances recovery from spinal cord contusion injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **107**, 11561-11566.

12.7 多唾液酸化神经细胞黏着分子阻止发育过程的细胞黏附

膜蛋白质糖基化的一项重要作用是呈献各种能被凝集素结合的末端结构。但是糖基化也可以用不同方式调控细胞黏附。这种对细胞黏附调控作用的一个很好的例子是细胞表面添加多唾液酸（polysialic acid）的效果。α2-8 连键中，由 8 ~ 100 或更多乙酰神经氨酸（NeuAc）残基组成的聚糖链，可以特异性地添加到神经细胞黏着分子（neural cell adhesion molecule, NCAM），通过在细胞表面间形成同型相互作用介导黏附作用。添加到 NCAM 上 *N*- 连接聚糖的多唾液酸链阻止这种同型相互作用，因而产生反黏附。多唾液酸的这种排斥作用是由其庞大体积和其载有的负电荷引起的。载有多唾液酸化 NCAM 细胞膜表面间的排斥作用，可能抑制其他细胞表

面受体以及由 NCAM 自身介导的黏附功能。多唾液酸的添加与细胞的活动能力或外形变化有关。因此，大脑发育过程中细胞的迁移和轴突的发育与 NCAM 多唾液酸化作用密切相关。当大脑发育变慢时，NCAM 多唾液酸化水平明显下降，表明成人大脑神经回路一旦建立，神经元之间稳定的相互作用次数随之增加。

12.8 免疫系统细胞分化过程中糖基化的变化

T 淋巴细胞对分化过程中细胞表面聚糖表达的细胞类型的调制提供了一个很好的例子。T 淋巴细胞发育与细胞表面受体 O- 连接聚糖表达的变化有关。胸腺中 T 淋巴细胞前体的胸腺细胞首先表达 T 淋巴细胞两辅受体 CD4 和 CD8。这两个双阳（$CD4^+CD8^+$）胸腺细胞既可以通过细胞凋亡进行阴性选择导致细胞死亡，也可以进行阳性选择使细胞只表达 CD4 或只表达 CD8（图 12.9）。在胸腺 T 淋巴细胞成熟过程中，由于向核心 1 型 O- 连接聚糖 GalNAc 残基 1-6 连键中添加 GlcNAc 所需的核心 2β-1,6-*N*- 乙酰葡糖胺转移酶（核心 2GnT）的表达减少，核心 2 型 O- 连接聚糖的表达有所变化。因此，发现核心 2 聚糖，如与胸腺皮质部分进行选择的未成熟、双阳（$CD4^+CD8^+$）胸腺表面的 CD43 蛋白质结合，不是与胸腺髓质 T 淋巴细胞成熟单一阳性（$CD4^+$ 或 $CD8^+$）蛋白质表面结合。核心 2GnT 和核心 2 聚糖与通过细胞凋亡出现自反应或无反应胸腺细胞阴性反应的发育阶段相互关联。核心 2 聚糖可以在 1-6 分支上与多聚乳糖胺进行延伸，为半乳凝素 -1 提供配体，半乳凝素 -1 通过细胞表面受体交联诱发细胞凋亡。

➲有关核心 1 和核心 2 O- 连接聚糖参见 **3.1** 节。

➲有关半乳凝素与细胞凋亡参见 **9.12** 节。

细胞表面受体聚糖的变化，也与 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞的阳性选择有关。这种从双阳未成熟胸腺细胞向只表达 CD8 成熟胸腺细胞的转换，与 CD8 上核心 1 O- 连接聚糖添加唾液酸有关。于核心 1 聚糖的半乳糖添加唾液酸的唾液酸基转移酶 ST3Gal-1，只由成熟的单阳胸腺细胞表达，双阳胸腺细胞不表达这种转移酶。缺失 ST3Gal-1 的敲除小鼠，$CD8^+$ T 淋巴细胞数目减少，为唾液酸化阳性选择的重要性提供了证明。CD8 O- 连接聚糖上唾液酸的存在，可以调制 CD8 和 MHC- Ⅰ类分子间相互作用的强度。胸腺中 MHC 分子出现在基质细胞上，胸腺细胞和 MHC 分子间的相互作用对 T 淋巴细胞选择非常关键。CD8 通常作为 T 淋巴细胞受体和为 T 淋巴细胞受体呈献识别肽的 MHC- Ⅰ类分子相互作用的辅受体。但是，CD8 也能与不被 T 淋巴细胞受体识别的 MHC- Ⅰ类分子结合。在发育的双阳性

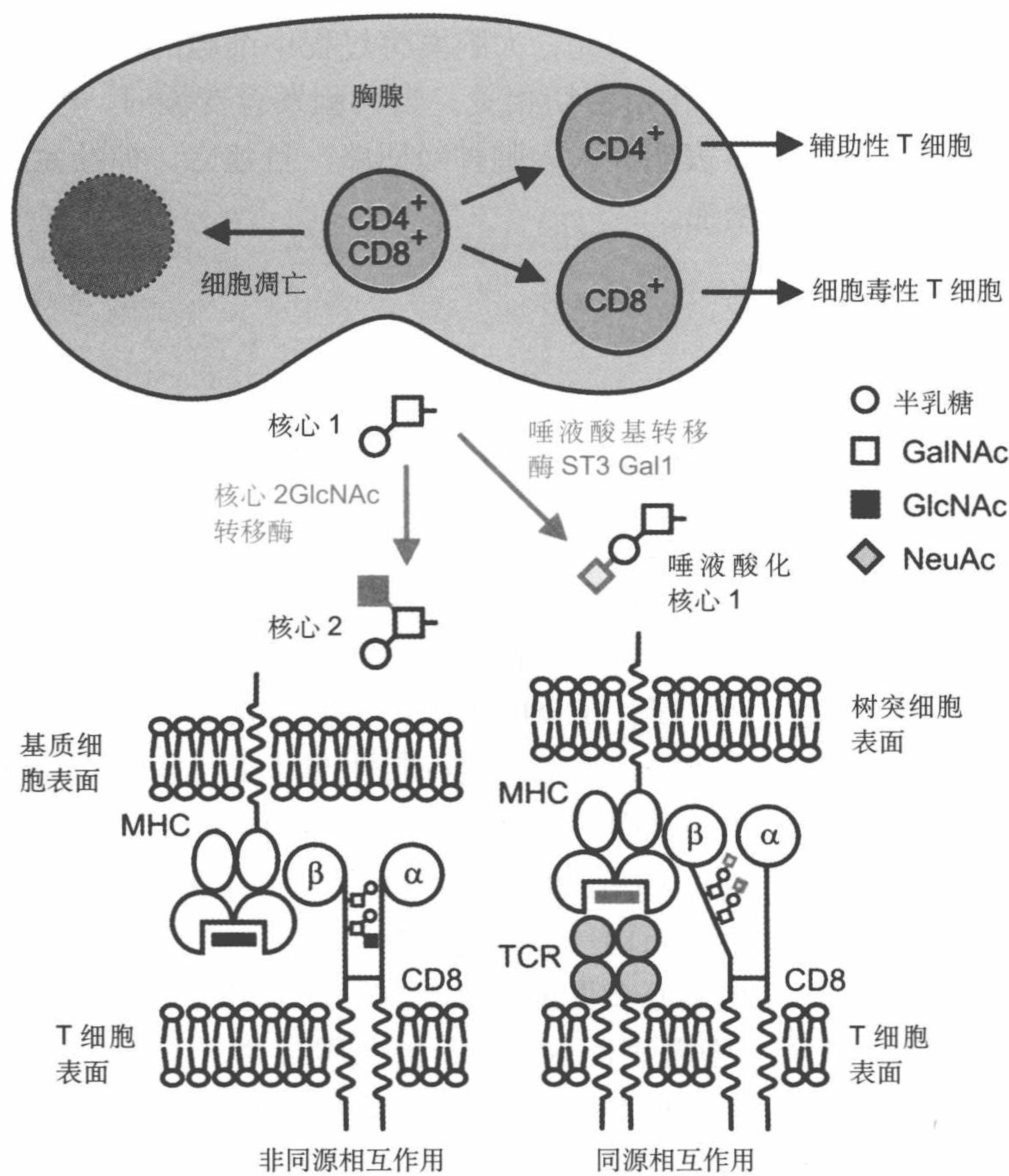


图 12.9　T 淋巴细胞成熟期 CD8 糖基化变化。当胸腺细胞从 $CD4^+CD8^+$ 双阳细胞到 $CD8^+$ 单阳细胞成熟时，核心 2 GalNAc 转移酶的表达下降，唾液酸基转移酶 ST3Gal-1 的表达增加，导致 CD8 上 O- 连接聚糖产生变化。在 CD8 杆区关键部位的唾液酸化核心 1 结构改变末端结构域的布置，因此，唾液酸化核心 1 结构，由与基质细胞上 MHC 分子非专一性相互作用改变为促进 MHC 分子与专一性识别结合肽 T 淋巴细胞受体之间的相互作用。MHC. 主要组织相容性复合体；TCR. T 淋巴细胞受体

胸腺细胞上这种 MHC- Ⅰ类分子与未唾液酸化 CD8 非同源性相互作用比 MHC-I 类分子与成熟 $CD8^+$ 胸腺细胞上唾液化 CD8 的相互作用具有更强的活性。CD8 和 MHC- Ⅰ类分子之间的非同源性相互作用，在阳性选择过程中对强化基质细胞与胸腺细胞的相互作用非常重要。唾液酸化在调制发育方面，为成熟的单阳胸腺细胞相互作用提供了一种关停的方法。

CD8 上唾液酸化的核心 1 O- 连接聚糖，在突出细胞表面免疫球蛋的

样结合域中β链多肽的杆区与几个苏氨酸残基结合（12.9）。还不清楚这些聚糖的唾液酸化作用是如何降低CD8对MHC-Ⅰ类分子的亲和力的。β链杆区聚糖的唾液酸化，可能诱发改变异源二聚体CD8αβ中免疫球蛋白样结构域定向的构象变化。另外，α和β免疫球蛋白样结构域的缔合可能因大型带负电荷聚糖的出现而有所减少。无论是哪种变化都可能降低CD8免疫球蛋白样结构域与MHC-Ⅰ类分子结合的亲和力。

小　结

这一章描述的遗传和生化结果，为多种型式的糖基化在建构脊椎和无脊椎动物器官发育、成熟的神经和免疫系统基本体制所起的重要作用提供了令人信服的证据。在这些过程中，有一些案例需要的特异性聚糖结构已经得到鉴定，但对多数这类聚糖如何发挥作用还缺乏了解，未来的主要目标应该规范这类聚糖的运作，确定这些聚糖是通过结合专一性受体，还是通过调制相互作用细胞表面分子的形状发挥作用。

主要参考文献

Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K., and Popko. B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability, *Cell* **86**, 209-219. 此论文描述了不能分成半乳糖脑苷脂或硫苷脂敲除小鼠的表型。

Collins, B. E., Ito, H., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., and Schnaar, R. L. (1999). Enhanced binding of the neural siglecs, myelin-associated glycoprotein and Schwann celt myelin protein, to Chot-1(alpha-series)gangliosides and novel sulfated Chol-1 analogs, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37637-37643. 介绍界定髓鞘相关糖蛋白延伸的糖结合专一性的实验。

Gascoigne, N. R.J. (2002). T-cell differentiation：MHC class I's sweet tooth lost on maturity, *Current Biology* **12**, R99-R101. 细胞表面聚糖如何调节淋巴细胞激活的建议新模型。

Jafar-Nejad, H., Leonardi, J., and Fernandez-Valdivia, R. (2010). Role of glycans and glycosyl-transferases in the regulation of Notch signaling, *Glycobiology* **20**, 931-949. 一篇关于刻缺蛋白上多种类型糖基化效应的论文。

Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Gimenez-GaUego, G., and Lindahl, U. (2001).

Sequence analysis of heparan sulphate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30744-30752. 界定硫酸乙酰肝素结合生长因子糖序列的关键实验。

Lander, A. D. and Selleck, S. B. (2000). The elusive functions of proteogtycans：in vivo veritas, *Journal of Cell Biology* **148**, 227-232. 在这篇深入思考的论文中，果蝇和哺乳动物突变对蛋白聚糖影响的比较。

Nawroth, R., van Zante, A., Cervantes, S., McManus, M., Hebrok, M., and Rosen, S. D. (2007). Extracellutar sulfatases, elements of the Wnt signalling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity in human pancreatic cancer cells, *PLOS One* **2**, e392. 此文描述了磺基酶可能通过糖胺聚糖重构调控生长因子活性。

Park, P.W., Reizes, O., and Bernfield, M. (2000). Celt surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 29923-29926. 这篇短评论文提供了包括硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与其蛋白质配体之间的详细相互作用，并且说明了这些相互作用调节细胞过程。

Pellegrini, L. (2001). Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling:a structural view, *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 629-634. 本文深入介绍了生长因子与肝素复合的晶体结构。

Rapraeger, A. C. (2000). Syndecan-regulated receptor signaling, *Journal of Cell Biology* **149**, 995-997. 关于细胞表面黏结蛋白聚糖在调节细胞基质黏附作用和信号传送作用的短篇报道。

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous systems, *Nature Reviews Neuroscience* **9**, 26-35. 详细评论了证明多唾液酸体内、体外的作用。

Schnaar, R. L. (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration, *FEBS Letters* **584**, 1741-1747. 在维护髓鞘中和神经再生中神经节苷脂作用的证明。

Schnaar, R. L. and Lopez, P.H.H. (2009). Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors, *Journal of Neuroscience Research* **87**, 3267-3276. 神经系统中髓鞘相关糖蛋白 (MAG) 的功能。

WaUis, G. A. (1995). Cartilage disorders. The importance of being sulphated, *Current Biology* **5**. 225-227. 发现在软骨疾病情况下，硫酸转运体基因突变，表明糖胺聚糖的磺化作用的重要性。

Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, P.L. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **96**, 9142-9147. 敲除葡糖基脑酰胺合酶基因的小鼠表型，防止鞘糖脂的合成。

习 题

12.1 论述糖基化在信号传送中的重要性。

12.2 对比下面文献中，硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与两种不同生长因子家族结合特异性的结果。

参考文献：Kreuger, J., Jemth, P., Sanders-Lindberg, E., Eliahu, L., Ron, D., Basilico, C., Salmivirta, M., and Lindahl, U. (2005). Fibroblast growth factors share binding sites in heparan sulphate, *Biochemical Journal* **389**, 145-150.

Pankonin, M.S., Gallagher, J.T., and Loeb, J.A. (2005). Specific structural features of heparan sulfate proteoglycans potentiate neuregulin-1 signalling, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 383-388.

12.3 讨论神经系统发育中聚糖 - 蛋白质相互作用的重要性。

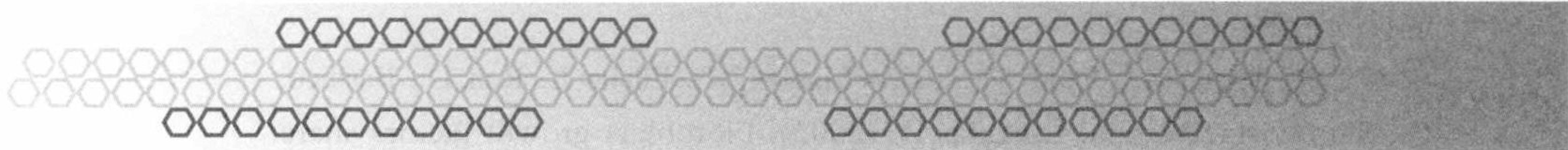
12.4 缺失参与聚糖合成酶的敲除小鼠，使我们对发育中聚糖的重要作用有了深入的了解，但敲除实验有时得出令人惊异的结果。解释缺失高尔基体甘露糖苷酶Ⅱ小鼠的意外表型，如何导致发现另一 *N*- 连接聚糖的合成途径。

参考文献：Chui, D., Oh-Eda, M., Liao, Y.F., Panneerselvam, K., Lal, A., Marek, K.W., Freeze, H.H., Moreman, K.W., Fukuda, M.N., and Marth, J.D. (1997). Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis, *Cell* **90**, 157-167.

12.5 通过边缘蛋白糖基转移酶修饰刻缺蛋白与 Delta 和 Serrate 相互作用产生延伸聚糖的机制尚属未知，对此提出建议性的作用机制。下面参考文献论文中提出了可能性机制的建议。评论支持此项建议的证据。

参考文献：Xu, A., Lei, L., and lrvine, K.D. (2005). Regions of *Drosophila* Notch that contribute to ligand binding and the nodulatory influence of Fringe, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 30158-30165.

13 糖基化与疾病



学习目的

学习本章后应知内容：

1. 聚糖生物合成系统缺陷引发的肌营养不良症和其他疾病的分子基础原理
2. 对糖的正常和异常免疫应答
3. 重组糖蛋白生产治疗药物的有关问题
4. 与癌症和其他疾病相关的糖基化的变异本质和可能产生的影响

本书很多地方都引用了糖基化异常或糖识别系统失败与疾病相关的例子。我们对聚糖及其受体的生物功能各方面的知识，很多是从自然发生的疾病或从敲除小鼠疾病表型得到的。这一章的主要目的是重点介绍与糖基化相关的一些疾病。与前面各章讨论的疾病举例一样，首先介绍的是两种遗传性疾病。另外，还介绍了一些由糖的化学反应、糖免疫应答和疾病表型有关的糖基化的变化引发的疾病，但是对有些这类疾病还不清楚其中的因果关系。

13.1 N- 连接聚糖合成酶突变导致先天性糖基化疾病

有几种先天性糖基化疾病 (congenital disorders of glycosylation, CDG) 的分子基础原理已经得到证实。这些折磨患者的遗传性疾病通常被认为是由血清糖蛋白糖基化，如由转铁蛋白变化引起的。在世界范围内只发现几百例患者患有这种罕见的疾病，这类病曾一度被称为糖类缺乏性糖蛋白综合征，这种综合征一般分为两种类型。这一组类型的综合征主要由正常 N-连接聚糖与血清糖蛋白结合组成，但是与对照血清糖蛋白相比，其潜在可应用的 N- 糖基化位点的结合频率有所减少。第二组类型的综合征，其全部或大部分通常的糖基化位点都已被占用，但是其结合聚糖的体积和复杂性都有所减小和降低。

第一组先天性糖基化疾病（CDG）起因于作为 *N*- 连接糖基化起始步骤供体的连接多萜醇高甘露糖前体集合体的减少。这一综合征两种形式的 CDG-1a 和 CDG-1b 的分子缺陷处于产生多萜醇 - 寡糖的生物合成途径（图 13.1）。CDG-1a 最常见的缺陷发生在磷酸甘露糖变位酶，一种正常情况下催化甘露糖 6- 磷酸异构化为甘露糖 1- 磷酸的酶。另一罕见形式的综合征（CDG-1b）起因于从岩藻糖 6- 磷酸产生甘露糖 6- 磷酸的磷酸甘露糖异构酶基因的缺陷。目前还不清楚产生的低糖基化是如何导致这些临床症状的，包括与这些病症相关的发育缺陷和肌肉张力的丧失。但是，细胞表面和基质糖蛋白缺陷可能与这些症状有关。相对少见的 CDG-1b 综合征有一个合成 GDP- 甘露糖的旁通途径，因为甘露糖可以直接磷酸化为甘露糖 6- 磷酸。食物中高含量的甘露糖可以满足多萜醇供体对恢复正常水平的需要，并由此防止血清糖蛋白的低糖基化。遗憾的是对其他 CDG 还没有这类治疗药物。

第二组 CDG 是由糖基化途径中的缺陷引起的。有一种这种病的病因是因为缺失负责在复合聚糖 1-6 支臂添加 GlcNAc 的 GlcNAc 转移酶Ⅱ。在这一综合征中，血清糖蛋白富含某些糖结构，在这些结构中 1-3 支臂犹如通常设计，但 1-6 支臂是被截短的。对 I 型 CDG 来说，很难根据分子缺陷解释观察到的表型。因此，利用对这类综合征的分析，不大可能对聚糖的确切功能提供深层的信息，但是能够确证复合聚糖在发育方面具有重要作用。

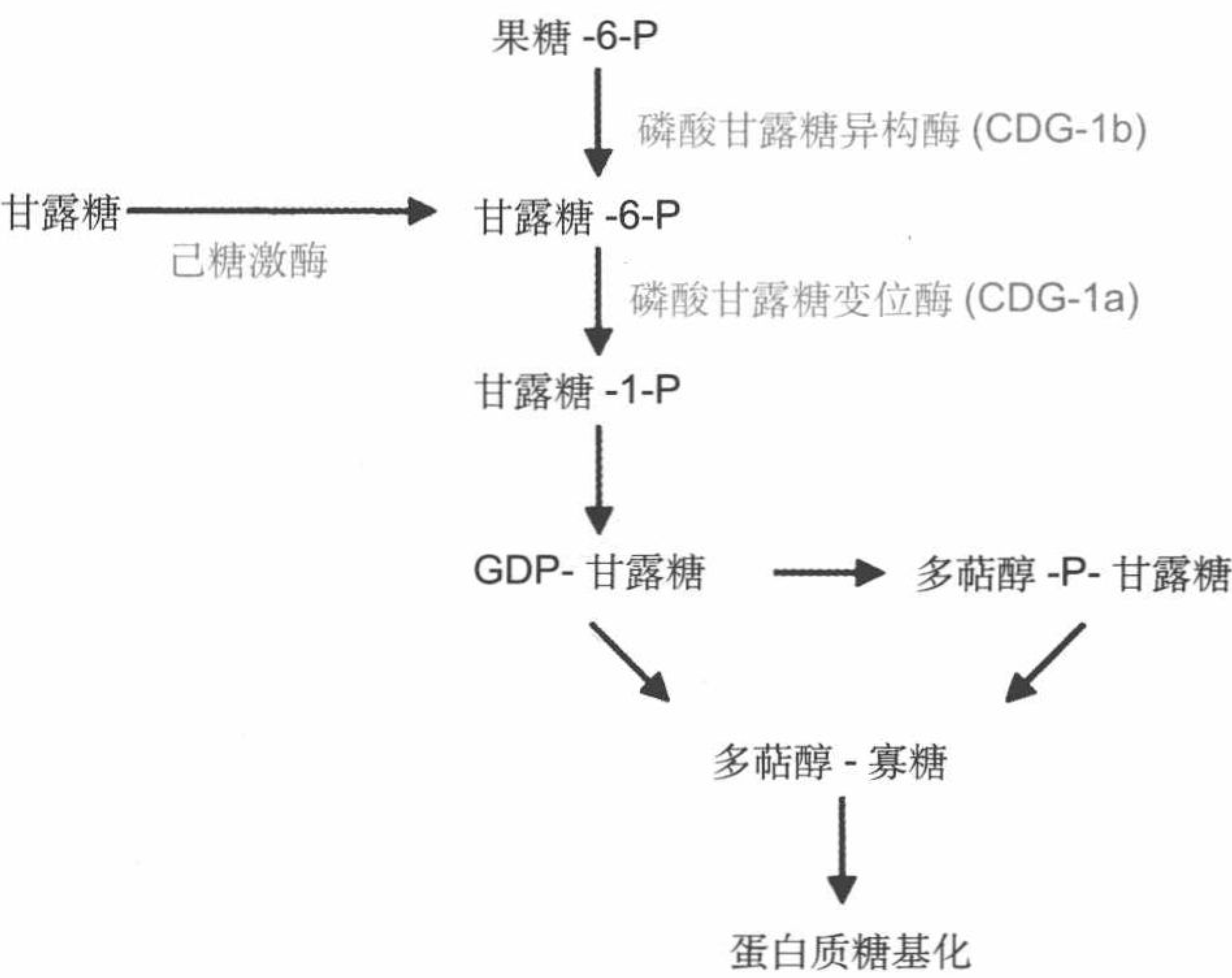


图 13.1 甘露糖掺入糖蛋白的途径。磷酸甘露糖异构酶或磷酸甘露糖变位酶的突变导致 CDG-1b 和 CDG-1a 发病。CDG-1b 可以用甘露糖治疗，因为己糖激酶能使缺失的酶通过旁通途径。GDP. 鸟苷二磷酸

13.2 糖基转移酶异常表达引发血凝缺陷

冯•维勒布兰德因子缺失（von Willebrand factor deficiency）是较为常见的出血症，发病率高至百分之一。最普遍形式的这种病单纯地按孟德尔方式遗传，表明这种病的起因是单一基因座改变。重要的是这一突变基因有效地占有主导地位。具有 von Willebrand 因子缺陷患者的血清水平，与正常人相比减少了 2/3 ~ 5/6，但是有少量因子存在，这一蛋白质的活性可以保持正常。由于 von Willebrand 因子对启动凝血级联系统必不可少，血清水平降低将导致创伤后过度出血。在人疾病小鼠模型中，突变基因位于染色体 11 区，编码 von Willebrand 因子的基因位于染色体 6。

在小鼠染色体 11 相关区中的一个基因，编码 *N*- 乙酰半乳糖胺（GalNAc）转移酶。在受损小鼠这一基因的编码区没有发现突变，但在启动子区的变化导致蛋白质在内皮细胞而不在上皮细胞表达（图 13.2）。由于 von Willebrand 因子形成于内皮细胞，正常情况下，不能与 GalNAc 转移酶相遇。转移酶的错误定位致使转移酶与 von Willebrand 因子共同在内皮细胞中表达，导致对 von Willebrand 因子添加末端 GalNAc 残基。分泌蛋白上的这种末端 GalNAc 残基成为无唾液酸糖蛋白受体的配体，这种配体可以清除循环系统中的异常糖基化因子。转移酶的活性可以辩解占优势

➡关于无唾液酸糖蛋白受体参见 **10.7** 节。

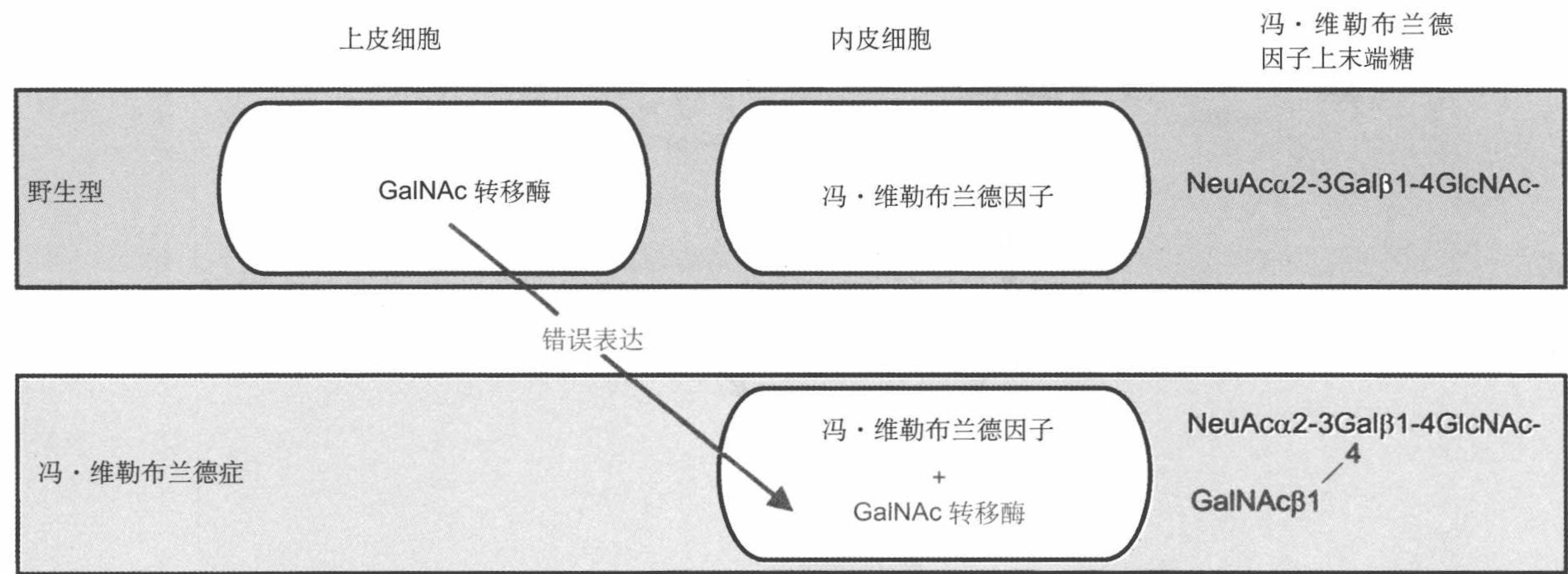


图 13.2 因 GalNAc 转移酶错误表达导致 von Willebrand 因子糖基化的改变。内皮细胞中存在的这种转移酶，在 von Willebrand 因子上催化添加末端 GalNAc 残基，通过无唾液酸糖蛋白受体使其成为清除的靶标

的表型，因为只要转移酶在内皮细胞表达，即使只有一个突变基因，全部 von Willebrand 因子均需添加 GalNAc 残基。

这些研究结果证实了糖基化的变化，明显地产生微妙的间接影响。虽然糖基化变化可能是整体总括性的，但是与这些变化相关的表型多数表明是针对一种或几种蛋白质。可能是 GalNAc 转移酶的错误定位造成内皮细胞中多种蛋白质糖基化异常，但是观察到的主要生理影响是出血症。

13.3 发生在糖尿病患者中的蛋白质化学糖化反应

通观全书，强调对糖蛋白添加聚糖，都需要特异性糖基转移酶的作用。虽然这一原理适用于正常形式的糖基化反应，但是糖与蛋白质也可以直接发生化学反应。这一过程被称为糖化反应（glycation）或非酶促糖基化反应。一般情况下，这种反应效果不是很好，只是像在糖尿病患者血糖水平非常高或这类蛋白质半衰期很长的特殊情况下才能观察到好的效果。

化学糖化反应发生过程的详细情况尚未完全了解清楚，但已经知道，与吡喃糖处于平衡状态的少量非环化形式的葡萄糖参与了这种糖化过程。出现在这一开链结构的自由羰基能与蛋白质的氨基形成希夫碱（Schiff base）（图 13.3）。当蛋白质和葡萄糖温育时，阿马多里反应（Amadori reaction）中双键迁移导致生成一种稳定性自发积聚的产物。糖尿病患者难以控制的血糖水平加速了这种糖化蛋白质的积聚，引发血糖水平急剧上升。因此，通过检测糖化血红蛋白，或血清清蛋白可以判断特定疗程胰岛素给药与饮食中糖负荷的适应程度。通过专一性受体可以清除循环系统血清蛋白的糖化产物。这类受体似乎与清除正常糖蛋白的动物凝集素不同，表明这类糖化产物的化学性能，与 N- 连接和 O 连接聚糖相比有很大不同。

阿马多里产物还可以继续以不同方式进行反应，如与另一氨基进一步反应导致产生交联（图 13.3）。糖化反应介导的一种长寿胶原蛋白的蛋白质交联，已成为糖尿病患者有关肾脏和血管损伤并发症的理论基础。在患者患病期间，都会出现这种反应，这种反应产物被称为渐进性糖化终产物（advanced glycation end product, AGE）。这类反应的有些产生在形成 Schiff 碱和进行阿马多里反应后，都含有多个共轭双键，因此可以吸收可见光区光线。这种发色团的形成在晶状体这样的正常透明组织中特别明显，结果可使晶状体变黄。构成晶状体的这种晶体蛋白不可能逆转，晶状体的损伤随年龄增长而不断积聚。

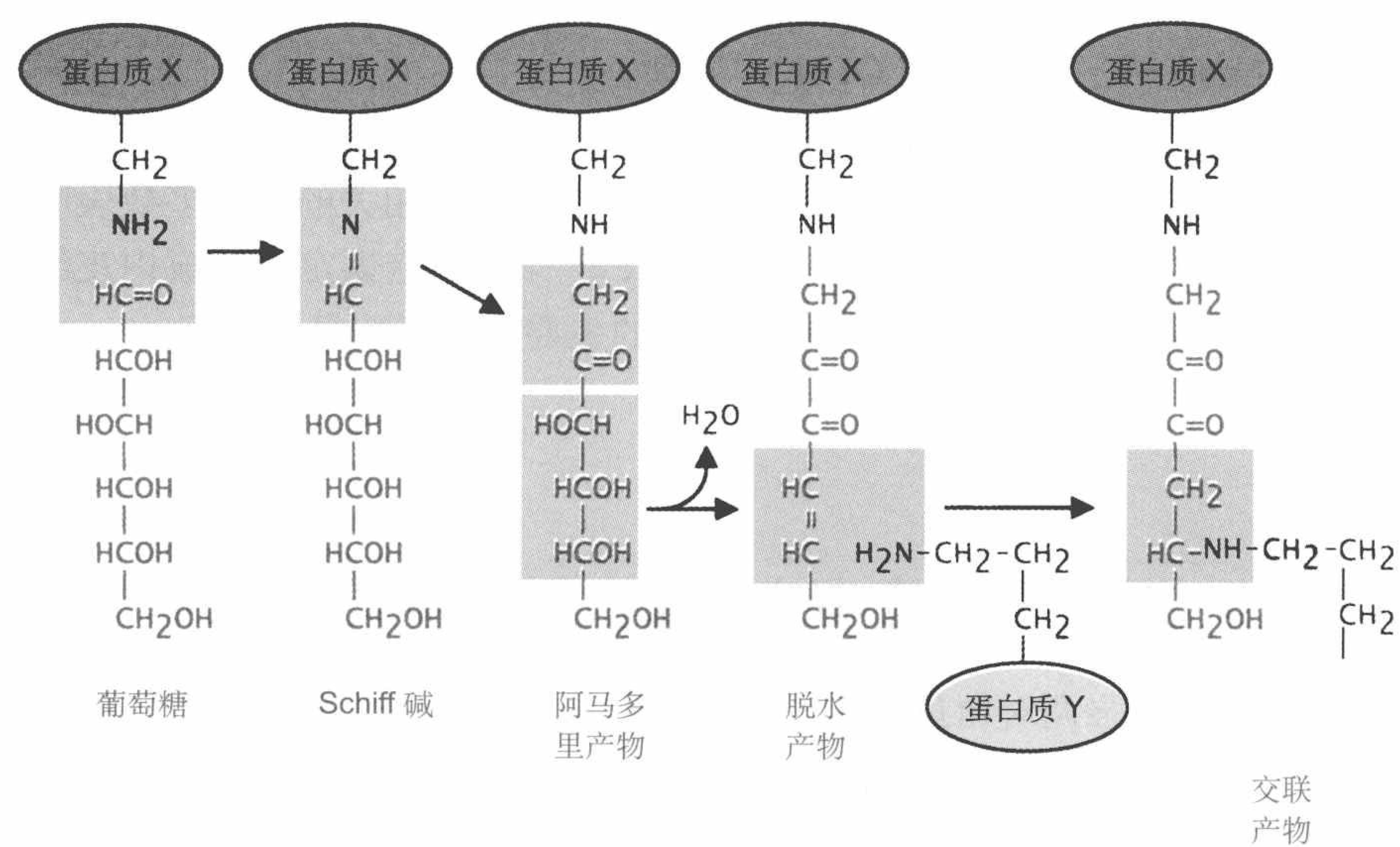


图 13.3　导致蛋白质交联和形成渐进性糖化终产物的糖化反应。图示血清中持续存在高浓度的葡萄糖与蛋白质赖氨酸侧链上氨基进行的反应。经过重排，再与另一蛋白质上赖氨酸侧链进行反应，产生蛋白质交联

13.4　糖抗体可能引发疾病

有关 ABO 血型参见 2.7 节。

ABO 血型系统明显地表现出糖具有抗原性质。不能合成 A 和 B 抗原表位末端糖结构的个体都发育这类抗原的抗体，因为饮食中都含这些聚糖。在自身细胞显示这种抗原的个体，从出生对抗原就有耐受性，并且不会产生抗体应答。因为人类群体的遗传多态性，这些聚糖及其抗体随个体的不同也有变化。正常情况下，因为抗原只在消化系统相遇，抗体应答无害。当载有一种聚糖的血液细胞从某一个体输入不能生成这一抗原的另一个体时，就会出现问题，因此需对抗原发育抗体。

在人和其他动物物种细胞上发现的因糖结构不同而形成的抗糖抗体也能引发疾病。包括旧世界灵长类动物在内的多数脊椎动物都含有 α- 半乳糖基转移酶基因，通过形成 Galα1-3Gal 连键，能够封端聚糖结构（图 13.4）。这一末端结构为 N- 连接聚糖的唾液酸化反应提供了另一种方式，但这种末端结构也可以与其他糖蛋白和糖脂聚糖结合。尽管人和新世界猕

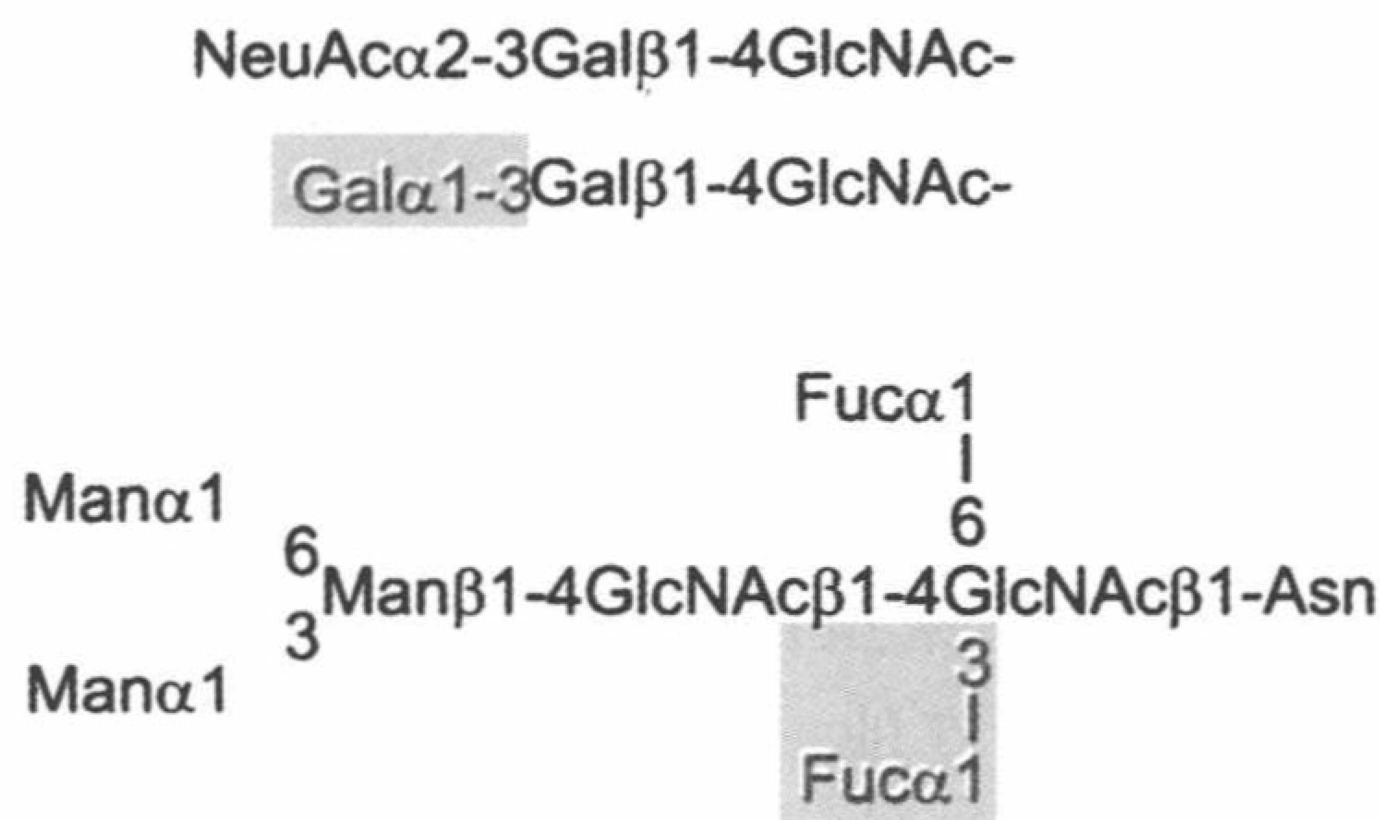


图 13.4 从新糖连键非人组织派生的抗原性糖结构。包括非人灵长动物在内的多数哺乳动物中，都存在 α- 半乳糖残基，而 α1-3 连接的核心岩藻糖残基多出现在昆虫糖蛋白中

猴中都存在 α- 半乳糖基转移酶基因，但并不在内源聚糖上表达，因此，Galα1-3Gal 抗原表位也不会在内源聚糖上出现。在 ABO 血型物质情况下，对食品和微生物上类似的抗原表位的环境接触，将导致在多数人中产生与末端 α- 半乳糖残基反应的抗体。这类抗体成为器官异种移植的主要障碍，因为从猪选取的供体器官，被末端 α- 半乳糖残基的抗体快速覆盖时，就会遭到超急性排斥。虽然可以从潜在的器官移植接受者血清中吸收抗体，缓解当时出现的问题，看起来，必须对缺失这种转移酶活性的动物，开发出能够作为兼容人免疫应答的器官来源。

有些糖异种抗原（xenoantigen）引发疾病，是因为糖异种抗原免疫应答性质引起的。例如，出现在 ABO 血型物质中的岩藻糖残基，是指区别于 N-连接核心中通常与 GlcNAc 残基结合的那些外臂岩藻糖残基。脊椎动物的这种核心岩藻糖残基，在 α1-6 连键中与内部连接天冬酰胺的 GlcNAc 残基结合（图 13.4）。这种修饰形式也在植物和昆虫的糖蛋白中出现，但这些物种中的岩藻糖可以单独地，或在 α1-6 连接的岩藻糖存在的情况下添加到 α1-3 连键内部的 GlcNAc 残基。可能是通过日常饮食暴露给这些糖蛋白，导致产生抗体。有些个体是以 IgE 应答方式产生抗体，因为 IgE 分子与抗原结合导致过敏反应，这些个体对含有双岩藻糖基化结构的聚糖过敏。最常见的暴露给这些聚糖的途径是通过蜂螫，因为蜜蜂毒液中的 N- 连接糖蛋白核心区是高度岩藻糖化的。在皮肤下面蜜蜂毒液的沉积，可导致所有个体产生局部反应，因为蜂毒肽蛋白，可以通过神经的去极化刺激神经。但是，具有识别双岩藻糖基化抗原表位循环 IgE 分子的个体，经常发生全身过敏性反应，在此反应中，IgE 从肥大细胞刺激释放的组胺和其他化合物可能引发肺部呼吸道致命性的缩窄。

13.5 制备治疗多种疾病的糖蛋白药物是对生物技术的挑战

目前生产的日益增加需要的糖蛋白药物中，很多是因为病情、刺激细胞生长和再生因子，以及用于靶向肿瘤细胞的单克隆抗体而缺失的药物，需要重新设计和制造。在这些糖蛋白中，像治疗溶酶体贮积病需要取代的酶，只用于少数患者，但是，其他一些，像治疗贫血的重组红细胞生成素、治疗凝血病的凝血因子和单克隆抗体等药物，都有潜在的广大销售市场。正因为糖赋予蛋白质像溶解度和水解酶抗力等物理性能（第 8 章）和错误聚糖的存在，可以通过甘露糖受体和无唾液酸糖蛋白受体这类胞吞聚糖结合受体，将糖蛋白靶向迅速清除，所以对这些蛋白质的正确和恰当的糖基化，显得特别重要。

➲有关酶置换疗法参见框 4.1。

➲有关红细胞生成素参见框 10.2。

➲有关清除糖蛋白参见 10.7 节和 10.8 节。

目前在中国仓鼠卵巢（CHO）细胞和婴幼仓鼠肾脏（BHK）细胞中制备的糖蛋白制剂，已批准作为人用药物。看起来，模拟人的天然糖基化最有效的方法是利用人的细胞。但是，出于安全方面的考虑，这一方法存在人类病毒污染的可能。虽然仓鼠细胞能生成具有复合 N- 连接聚糖的糖蛋白，但生成的典型糖蛋白很少有支链，并且载有更多的核心岩藻糖，而且比典型人的糖蛋白具有更多的连接唾液酸的 α2-3 连键和较少的 α2-6 连键。仓鼠细胞还可以生成不均一性的聚糖混合物，这也是一个颇为重要的问题，因为每批产品糖形的分布可能有所变化，糖形的活性和半衰期各异。因此，利用突变细胞系可能生产均匀的糖基化产品，尽管生成的形式可能不是最好的。

➲有关突变体 CHO 细胞参见 5.7 节。

在工业生产规模上可以利用的两个生产系统，包括生产寡甘露糖短链的昆虫细胞系统和在不同物种中生产甘露糖聚糖型延伸链的 N- 连接聚糖的酵母系统（图 13.5）。在利用这些细胞生产重组糖蛋白时采用了两种研究方法：体外重塑聚糖或糖基化机构的工程化。在体外糖基转移酶反应中，可以利用昆虫的寡甘露糖结构直接作为添加末端糖的底物。甘露糖苷酶可以用来减少酵母糖蛋白，使寡甘露糖的数量达到同样的修饰水平。另外，内切糖苷酶可以用于置换核心结构。在体内研究方法中，为了能直接生产完整型哺乳动物聚糖，酵母系统已经设计建造了掺入分支 GlcNAc 转移酶和半乳糖基转移酶，以及使其成为可使用底物所需的酶和转运体，同样也尝试着使昆虫细胞系统工程化。弯曲杆菌的糖基化机制成功地转移进入大肠杆菌也为细菌中生成糖蛋白开辟了新途径，尽管对这一过程中某些特异性步骤还需要进行重要的修饰，可以说，糖基化工程领域已取得了很大进展。

➲有关作为合成工具的糖基转移酶参见 6.11 节。

➲有关细菌糖基化参见 11.2 节。

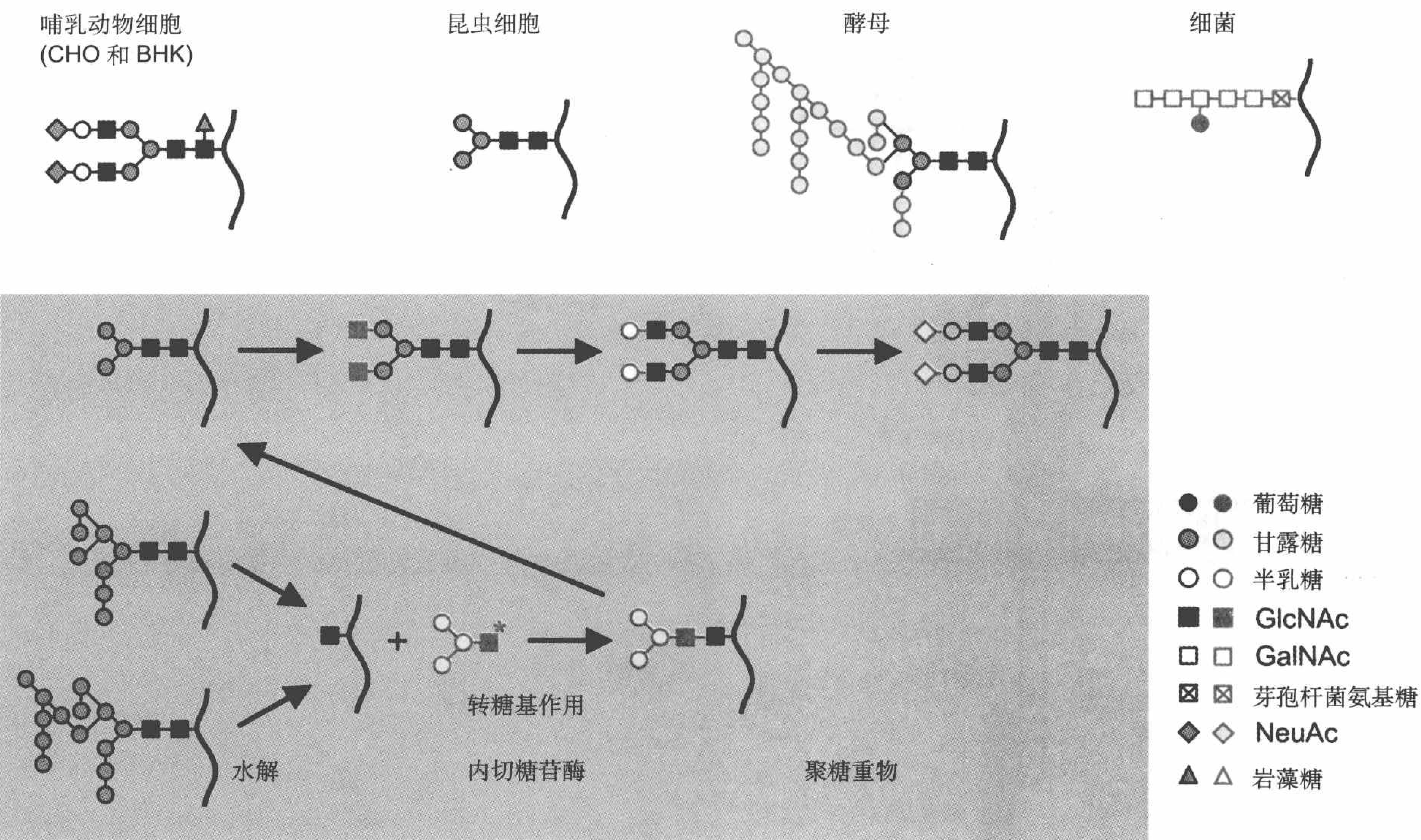


图 13.5 在各种系统重组糖蛋白表达的 N- 连接糖基化反应。对各系统与人成熟的复合聚糖不相符合的结构区予以特别标出。糖蛋白的重构方法包括从噁唑啉 (oxazoline) 供体开始，用内切糖苷酶转糖基活性进行的核心修饰，以及用糖基转移酶进行的末端修饰。噁唑啉基团用 * 表示

13.6 修饰异常 O- 连接聚糖的遗传变化可能引发肌营养不良症

近期在先天性（遗传性）肌营养不良症的研究中，对一种新型 O- 连接聚糖产生了兴趣，这种 O- 连接聚糖中的甘露糖与丝氨酸或苏氨酸连接，出现在肌营养不良蛋白聚糖蛋白质上，形成联结细胞骨架和胞外基质复合物的一部分（图 13.6）。肌营养不良蛋白聚糖这一名称反映出这种蛋白质作为胞质肌动蛋白结合肌营养不良蛋白膜固着点的作用，而肌营养不良蛋白名称也是从这种蛋白质的序列改变引发最常见形式肌营养不良症派生的。肌营养不良的肌肉萎缩特征被认为是肌营养不良蛋白不能保持肌纤维的正常结构。在肌营养不良蛋白多肽 α 亚基中心，有总数 20 多个 O- 连接

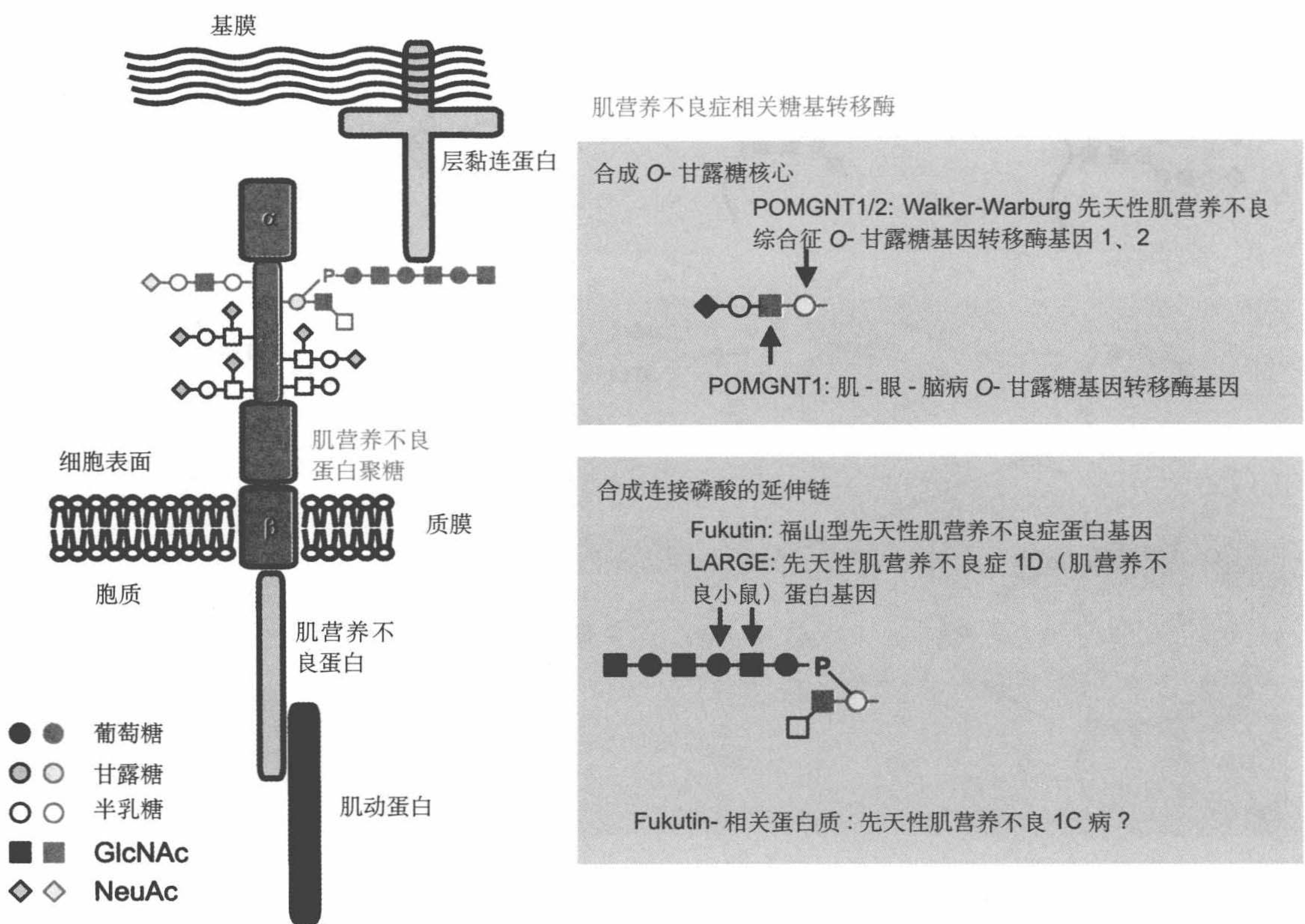


图 13.6　先天性肌营养不良症中 α- 肌营养不良蛋白聚糖的异常糖基化。肌营养不良蛋白聚糖的作用是与胞外基质连接胞内细胞骨架。在不同突变形式的肌营养不良症的 5 种糖基转移酶中，合成连接核心甘露糖的聚糖需要其中的两种糖基转移酶。LARGE 和 Fukutin 蛋白质可能是这两种推定的糖基转移酶，通过 6- 羟基磷酸二酯连键，合成 *O*- 甘露糖结合的多聚体重复序列

聚糖与富含丝氨酸和苏氨酸区结合，并在 N 端和 C 端球形域之间形成延伸区。这些聚糖都是连接 GalNAc 的典型黏蛋白型结构和连接甘露糖异常寡糖的混合物。有一种是四糖形式的连接甘露糖的聚糖，其中甘露糖残基与 GlcNAc、半乳糖和唾液酸残基结合，进行延伸。糖基化的肌营养不良蛋白聚糖的分子质量大约两倍于核心多肽（75 kDa）。肌营养不良蛋白聚糖除在肌肉细胞表达外，还以稍有不同糖基化形式在脑、眼中神经元表面表达。

因蛋白质氨基酸序列变化，产生了 5 种先天性肌营养不良症，根据序

➡有关糖基转移酶序列参见5.3节。

列的相似性，这些蛋白质好像是糖基转移酶。这些突变序列导致肌、脑和眼出现不同的发育缺陷症状。已经知道其中两种蛋白质参与催化合成O-连接甘露糖聚糖添加甘露糖和GlcNAc最初的两个步骤。引发肌营养不良症的这两种突变蛋白质造成α-肌营养不良蛋白聚糖糖基化的急剧减少，使肌营养不良症患者细胞中糖基化的分子质量约减少60 kDa。随糖基化变化，还出现了肌营养不良蛋白聚糖与胞外基质蛋白质层黏连蛋白结合能力的丧失。虽然对这种结合能力丧失的确切影响还不清楚，但可以证明，在肌营养不良蛋白聚糖与层黏连蛋白的相互作用中连接甘露糖的聚糖，具有重要作用。层黏连蛋白的G型重复序列可以与糖结合，但在甘露糖连接的四糖末端结构和用降解聚糖的糖苷酶治疗肌营养不良蛋白聚糖抑制作用研究中表明，G型重复序列不能中断层黏连蛋白与肌营养不良蛋白聚糖的结合。

当其他一些肌营养不良症中推定的糖基转移酶的活性被界定后，有关甘露糖连接O-聚糖功能的混淆情况，就可以得到澄清。在这些蛋白质中，至少有一种*LARGE*基因产物蛋白质参与了催化新生聚糖的合成，这一蛋白质含有两个潜在的糖基转移酶催化结构域，已经表明这两个催化域具有葡糖基转移酶和GlcNAc转移酶活性。据此，与合成例如肝素的糖胺聚糖链的双功能酶类比，这一LARGE蛋白质也可以合成葡萄糖-GlcNAc二糖重复单位延伸链。当这类聚糖被清除时，这种与肌营养不良蛋白聚糖中心结构域结合的重复二糖链将成为解释分子质量大幅度变化的理由，并为结合层黏连蛋白提供靶标。

由LARGE蛋白质合成的聚糖延伸链是通过磷酸二酯连键与核心甘露糖残基连接得到证实，对了解肌营养不良蛋白聚糖上聚糖的功能是一大突破（图13.6）。阻止在O-连接甘露糖添加GlcNAc的POMGNT1突变可能降低磷酸化效果，但是剩余结合的一些磷酸还可以设计数目减少的延伸链，这种延伸链还可以对肌-眼-脑病的病因与这些突变相关的轻微症状作出解释。有些磷酸的存在，也可以解释LARGE超表达为什么能增强α-肌营养不良蛋白聚糖的糖基化作用和恢复患有POMGNT1突变患者肌肉前体细胞中层黏连蛋白的结合，很可能是因为延长链的添加提高了糖基化和结合的效果。但是，在没有正常可用的接纳体时，由LARGE转移酶生成的聚糖也可以在N-连接和O-连接聚糖上表达。

由于LARGE的超表达可以抵消引发肌营养不良症的多种基因缺陷，LARGE的转基因表达可以作为治疗与糖基化有关的全部肌营养不良症行之有效的方法。除肌营养不良蛋白聚糖外，还在脑中发现了另一些具有高水平酶和高水平甘露糖连接O-连接聚糖的O-甘露糖基转移酶蛋白质的底

物。在上皮肿瘤细胞中，LARGE 蛋白质活性的降低与促进癌症发展的黏附作用丧失有关，因此，*LARGE* 也被认为是抑制肿瘤的基因。

另一种超表达的糖基转移酶也可以作为肌营养不良蛋白基因突变引发的最常见肌营养不良症的治疗药物。正常情况下，这种细胞毒性 T 淋巴细胞或 CT 抗原，在神经肌肉接头处表达。在营养不良肌肉中，负责合成这种抗原的 CT GalNAc 转移酶的超表达，可以防止肌肉萎缩。CT GalNAc 转移酶超表达使肌营养不良蛋白同源物的肌营养不良相关蛋白（Utrophin）增加，通过一种尚未了解清楚的机制，肌营养不良相关蛋白可以置换有缺陷的肌营养不良蛋白。

13.7　糖基化的变化与癌症相关

对疾病表型与糖基化变化的相互关联最深入的研究是在肿瘤生物学领域。多数这种变化是用抗体对糖进行鉴定。例如，利用识别有关具有特异血型聚糖的抗体，或者只识别发育早期正常情况所见细胞表面聚糖的抗体。在后者情况下，抗体识别的这些结构被称为癌胚抗原（oncofetal antigen）。结构研究证实，与正常组织相比，肿瘤中这些抗体的反应性能的提高或下降导致出现在分泌和细胞表面糖蛋白的糖结构产生特异性变化。多数情况下，这类结构变化，已经在正常细胞转化为肿瘤细胞过程中，进一步与一种或多种糖基转移酶活性形成了相互关系。继续关注这些变化有以下三项重要原因：

- 糖基化变化，可能说明某些肿瘤细胞的表型产生了变化；
- 可以利用糖基化的特异性变化作为肿瘤类型的诊断标志；
- 有望利用糖基化的这些变化治疗癌症。

根据我们目前对基因突变和肿瘤发生细胞原癌基因的了解，可以排除转化过程中糖基化的变化成为代表启动和基本变化的可能性。但是，了解糖基化变化是否成为肿瘤细胞非可控增长基因变化与肿瘤转移联系链的一部分，或者糖基化改变仅有导致肿瘤细胞性质变化的旁观效应，仍具有重要意义（图 13.7）。对上述前一种情况，纠正异常糖基化，可能直接导致肿瘤治疗的机会，即使在后一种情况下，糖基化的变化也可以作为检测和攻击肿瘤细胞有用的标志（框 13.1）。

●有关蛋白聚糖和生长因子参见 12.1 节。

有几种方式糖基化变化可能导致形成癌症有关的细胞表型。例如，由于细胞表面蛋白聚糖结合的糖胺聚糖可能影响细胞表面生长因子的活动，

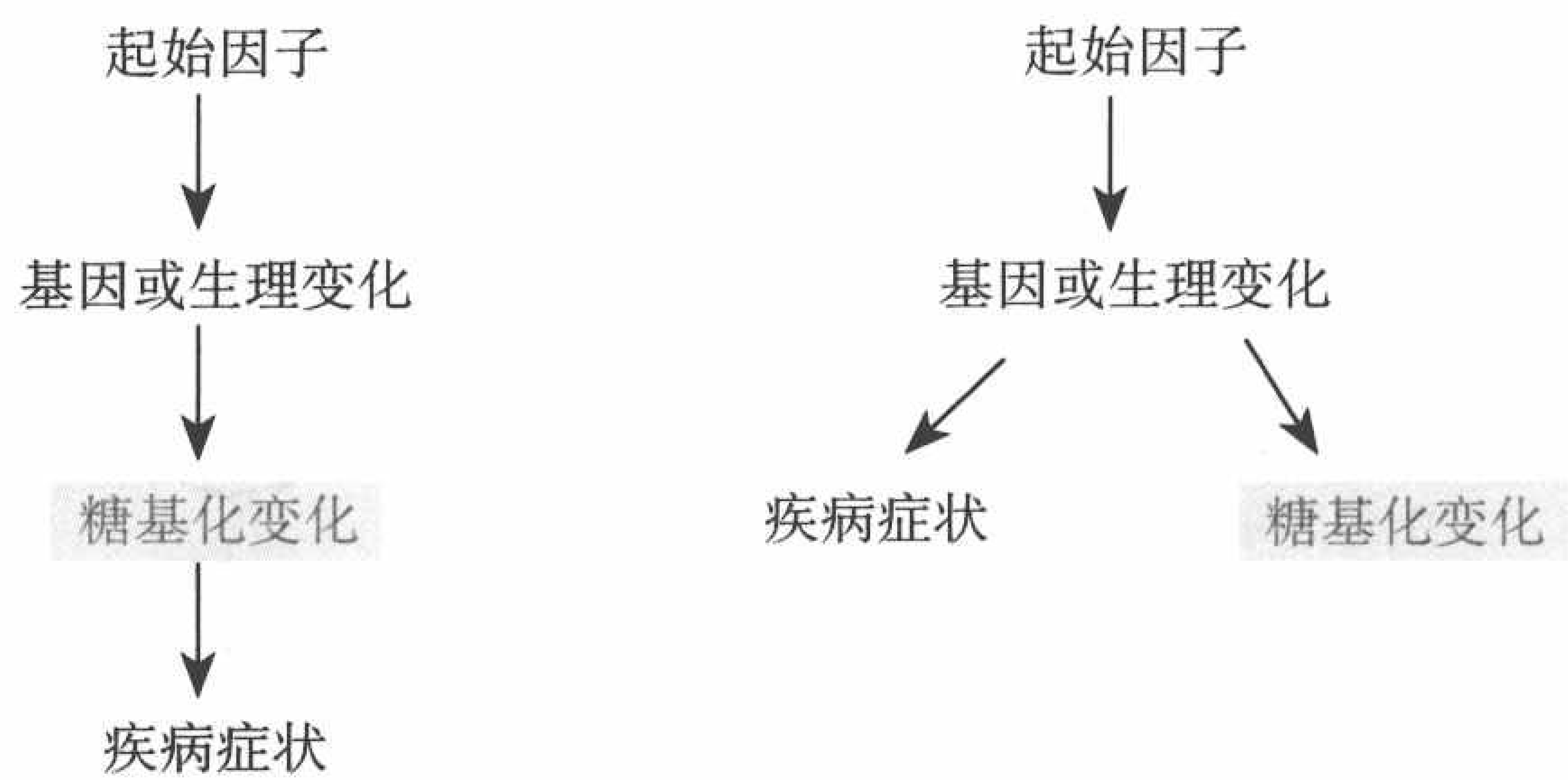


图 13.7 癌症以及其他疾病症状的发展与糖基化的相互关系。有些情况下，糖基化的变化可能是导致症状的原因，因此，介入糖基化的变化可能有助于治疗。另一些情况，糖基化与疾病相互有关，但并不是导致症状的原因，这种变化依然可以作为诊断的标志

糖胺聚糖的结构变化很可能影响细胞对生长因子的应答，因此，也会影响其复制的能力。同样情况，细胞表面聚糖的位置及其在细胞黏附中的作用，表明糖基化的变化可能参与了转移细胞从体内某一部位到另一部位的转移活动。糖基化的变化可能导致与原发肿瘤细胞扩散有关的黏附丧失作用，或者在新位点确立继发性肿瘤，重新启动细胞黏附过程。

因为已知像涎免凝素，特别像选凝素这类凝集素可以介导细胞黏附作用和正常细胞的外渗作用，因此，在转移过程必定发生的各类型黏附事件中，对聚糖和结合聚糖受体的作用肯定已有先例，而且对其在转移中的参与肯定提出过建议性的模型（图 13.8）。

➔有关选凝素参见 **9.5** 节和 **9.6** 节。

肿瘤细胞潜在的转移能力与细胞表面糖蛋白唾液酸化的增添有密切联系。唾液酸化增加的一个重要原因源自高度转移细胞上 N- 连接复合寡糖分支的增多，而分支的增多是因为典型二天线结构上添加 1-6 连接的 GlcNAc 形成三天线结构的 GlcNAc 转移酶Ⅴ活性的提高（图 13.9）。在额外分支上添加末端唾液酸，有助于解释清楚细胞表面总体唾液酸化的增加。模型系统变体细胞中 GlcNAc 转移酶Ⅴ的活性与转移潜能变化，以及与展现不同分支水平导致转移性状相应变化的细胞选择有密切的联系。例如，苦马豆碱（swainsonine），这种加工 N- 连接聚糖的抑制剂，可以降低细胞表面唾液酸化复合 *N*- 连接聚糖的水平，这类抑制剂还可以逆转体内、体外肿瘤细胞的一些生长和转移性能。看起来，这种特异性糖基化的变化，在肿瘤细胞特性中确实具有重要作用。但是，还没有建立肿瘤转移事件有关唾液酸化和分支变化参与的专一性分子机制。

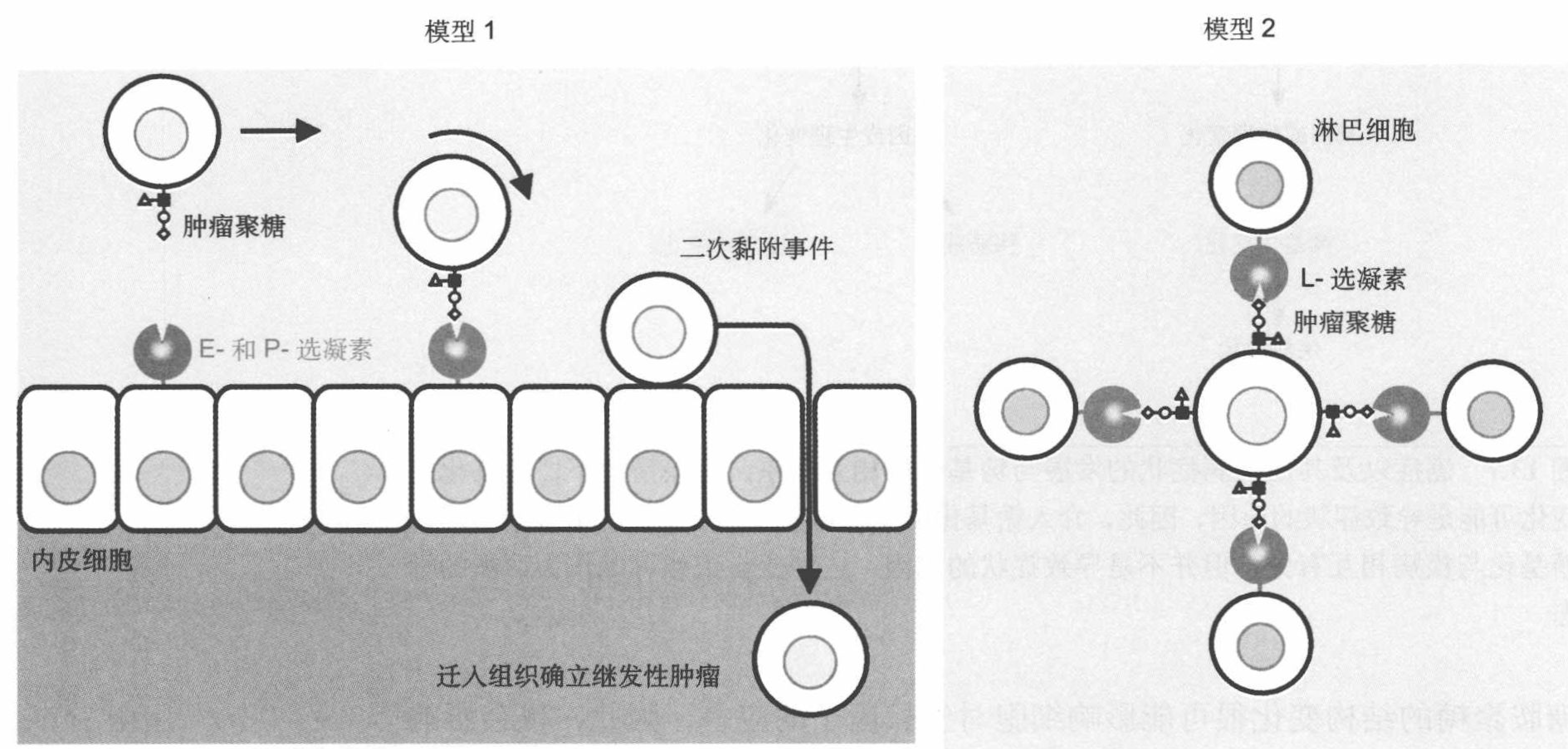


图 13.8　肿瘤转移中，结合唾液酸化聚糖选凝素的潜在作用。从原发肿瘤释放进入血液的细胞表达唾液酸 -Lewis^{x} 和有关的表位。模型 1 中，E- 选凝素和 P- 选凝素，以其在正常情况下，促使嗜中性粒细胞外渗的同样方式，直接促使肿瘤细胞移动进入组织。模型 2 中，结合聚糖的 L- 选凝素，导致淋巴细胞附着于肿瘤细胞，形成寄居于组织的微型栓子

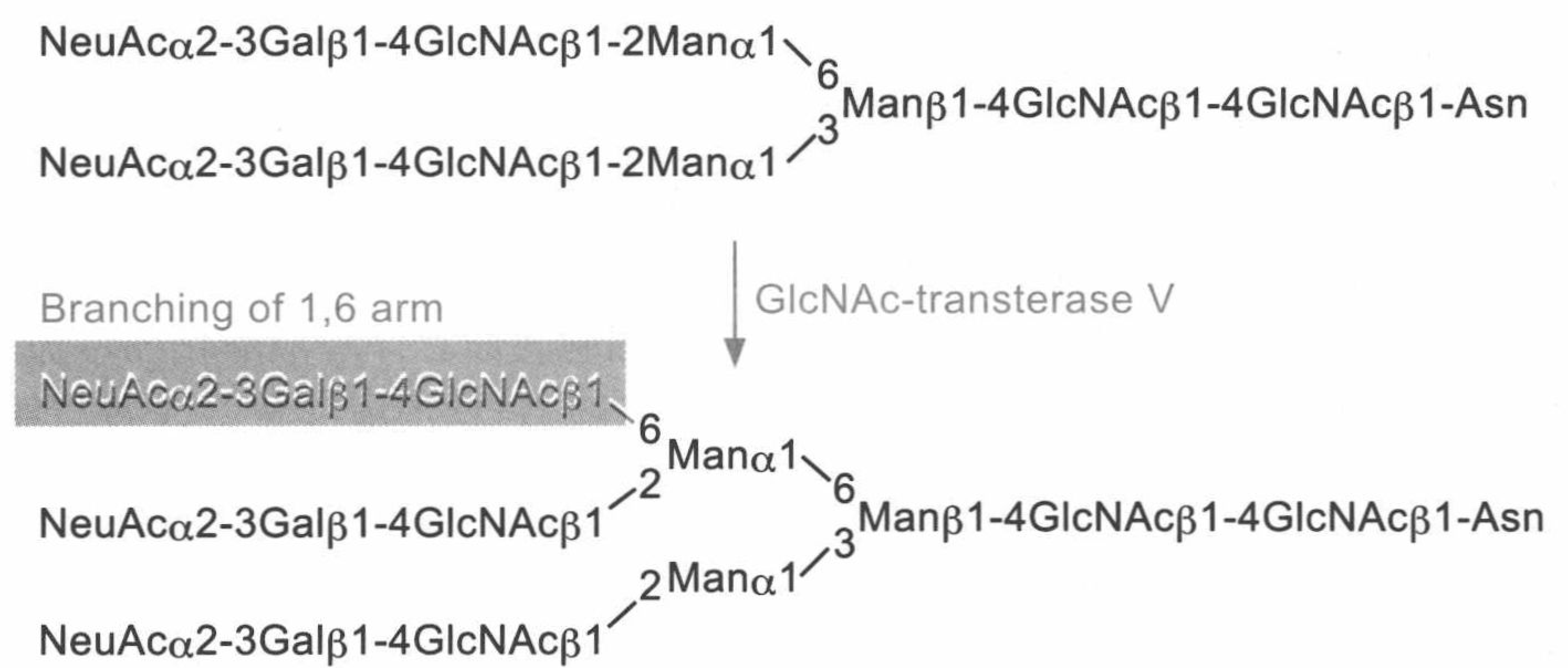
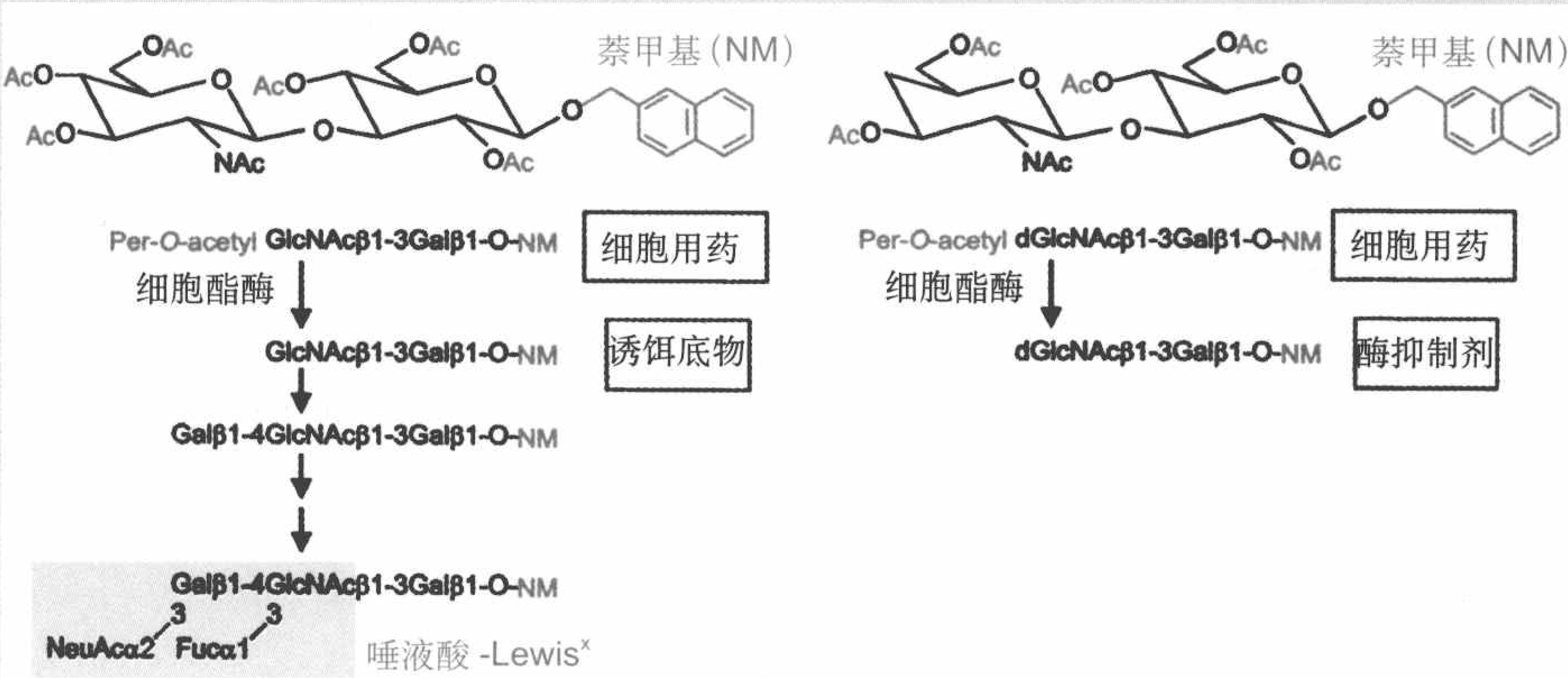


图 13.9　因肿瘤细胞中 GlcNAc 转移酶 V 活性而产生的多分支 *N*- 连接聚糖。继续添加唾液酸末端分支，可能增加细胞表面聚糖与唾液酸结合凝集素之间的相互作用

框 13.1 糖类治疗药物：*修饰肿瘤细胞聚糖的药品，可能用于治疗癌症*

肿瘤细胞表面的糖基化变化影响癌症发展的事实，可能为开发抗癌药品提供依据。如同近来曾试图调制癌组织上唾液酸化抗原表达的例子一样，修饰肿瘤细胞表达的聚糖是治疗肿瘤的一种方法。包括结肠、乳腺和肺癌组织，特别是一些具有转移倾向的癌组织都来自上皮细胞。临床和实验提供了证据，支持肿瘤细胞增选选凝素为转移黏附系统这一概念。例如，癌组织上唾液酸 - Lewis^x 和唾液酸 - Lewis^a 抗原表达程度与其转移潜能之间有良好的相互关系。缺失 P- 选凝素小鼠中，肿瘤转移消失的事实，对选凝素在肿瘤转移中的作用再一次提供了证据。



这一信息表明，阻止选凝素 - 聚糖的相互作用，可能是减少肿瘤转移的一种方法。已经证实，直接封阻这种相互作用非常困难，因为像唾液酸 - Lewis^x 四糖这种可溶性配体，难以作为服用的药品，并且在与细胞表面结合上也存在困难。对这种方法曾通过抑制选凝素进行过研究，并试图在控制炎症上试用，但未能取得成功。因此，目前正设法降低肿瘤细胞靶聚糖的表达水平研究另一方案。利用作为引物和以正常膜糖蛋白底物为代价，通过糖基转移酶进行延伸的底物诱饵分子淹没肿瘤，研究另一方法，并由此减少细胞表面糖蛋白的糖基化。由于糖基转移酶对其接纳体底物具有典型的高亲和力，阻止产生选凝素 - 配体所需的诱饵水平，远低于抑制选凝素 - 聚糖直接作用所需的水平。在另一有关的方案中，缺失 4- 羟基的接纳体可以直接用作半乳糖基转移酶的抑制剂。利用二糖可以获得合适的亲和力。以大型疏水基团创建糖苷，有助于生成极化较少的化合物，但是，如果为了使它们能够穿越质膜，这些化合物需要以过 - 氧 - 乙酰化（per-o-acetylated）的形式服用。胞内 *O*- 乙酰基水解可以产生游离的诱饵和抑制剂分子。细胞介质中，药品浓度低至 25μmol/L 导致胞内游离糖水平能够减少细胞表面唾液酸 -Lewis^x 表达的 50%。经过处理的细胞注入小鼠，显示渗入器官的活性下降，并形成群落，因此，初步表明诱饵治疗方案可能是行之有效的治疗方法。

论述题

• 论述选凝素 - 配体相互作用在肿瘤转移中的重要作用。

• 以癌症和流感病毒为例，对作为治疗药剂的糖基化抑制剂和聚糖 - 受体相互作用抑制剂进行对比。

主要文献

• Brown, J R., Yang, F., Sinha, A., Ramakrishnan, B., Tor, Y., Qasba, P.K., and Esko, J.D. (2009). Deoxygenated disaccharide analogs as specific inhibitors of β1-4-galactosyltransferase 1 and selectin-mediated tumor metastasis, *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4952-4959.

• Fuster, M.M., Brown, J.R., Wang, L., and Esko, J.D. (2003). A disaccharide precursor of sialyl Lewis^x inhibits metastatic potential of tumor cells, **Cancer Research 63,** 2775-2781.

• Kim, Y.J., Borsig, L., Varki, N.M., and Varki, A. (1998). P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **95**, 9325-9330.

• Weston, B.W., Hiller, K.M., Mayben, J.P., Manousos, G.A., Bendt, K.M., Liu, R., and Cusack, J.C., Jr. (1999). Expression of human α(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells, *Cancer Research* **59**, 2127-2135.

13.8 糖基化的变化可能作为检测和治疗癌症的生物标志

对糖基化变化与肿瘤病情发展的相互关系即使缺乏全面了解，糖基化变化也可以作为癌症检测和治疗的重要手段。有些糖基转移酶的激活特别与某些类型的肿瘤相关。产生的糖基化变化不管是否与肿瘤发展或扩散有关，这些变化都可以作为诊断或预兆指示性的生物标志（biomarker）。例如，由截短的O- 连接聚糖 NeuAcα2-6 Gal NeuAcα-Thr/ser 组成的唾液酸 -Tn 抗原表位（sialyl-Tn-epitope）高水平地暴露在各类癌组织上。高亲和力和高度专一性识别这一结构的单克隆抗体，可用于建立表达和患者存活之间的相互关系。不同水平的糖抗原表位，也可以用于监控化疗的效果。

通过刺激肿瘤细胞专一性抗原的免疫应答，靶向杀死癌细胞已成为癌症研究的长远性目标。研发这类免疫治疗方法的最大挑战是鉴定肿瘤细胞真正的抗原，因此才可以开发肿瘤的特异性抗体。在被动的免疫疗法中，

这些抗体可能与外源性毒素、药品或同位素标记缀合，而后特异性地导向肿瘤。另外，可用肿瘤特异性聚糖为基础的免疫原，通过寄主免疫系统刺激细胞毒性应答。这种与转化作用有关的糖基化变化和肿瘤细胞上新生糖抗原表位的出现表明糖在这些治疗方案中可以作为合适的靶标。

细胞表面聚糖的许多变化是由致癌转化造成的，但是这些变化常常导致肿瘤细胞腔内区室中糖基转移酶活性相对微弱的定量变化。虽然不同的聚糖结构分布有重大变化，但肿瘤细胞表面只有少数结构是特异的。这种情况给鉴定肿瘤特异性糖抗原带来很大困难。尽管如此，糖链疫苗的试制仍在继续，而且近期基本上在不受限制的情况下提供同源抗原合成寡糖取得的进展，使此项研发受到很大鼓励。应用这种疫苗可以产生特异性的抗体应答，但在指导合适的细胞毒性抗体方面仍然存在很大的挑战。多数抗糖抗体是 IgM 类人体免疫球蛋白，不是 IgG 免疫球蛋白，可能靶向细胞裂解的效果较差。产生预期效果的应答，可能还需要细胞毒性 T 淋巴细胞应答，开发能够引起这类应答的抗原和佐剂可能还存在一定的困难。

有关化学合成聚糖参见 **6.10** 节和 **6.11** 节。

乳腺癌中与糖基化变化有关的一种具有潜在用途的抗原，实际上是肽抗原。黏液核心蛋白 -1（MUC-1）是乳房上皮细胞表面重要的黏蛋白。MUC-1 的核心肽是一种延伸穿膜蛋白质，由载有多个 O- 连接糖基化位点的 20 个氨基酸串联重复序列组成。乳腺上皮中这些正常的位点多由核心结构 -2 占据，而肿瘤细胞中这些位点则与核心结构 -1 连接。这种变异与短型 O- 连接聚糖链的转变有关。而这种转变是由结束合成核心结构 -1 的唾液酸转移酶和合成核心结构 -2 的 GlcNAc 转移酶的相对活性变化引起的（图 13.10）。重组实验表明这两种酶竞争，接近高尔基体内底物，因此，唾液酸转移酶活性增高，GlcNAc 转移酶活性降低导致 O- 连接核心结构的转换。已有实验证实，可应用的连接 O- 连接聚糖的潜在位点不是很多。由于这些变化，正常情况下被糖遮蔽免疫系统的 MUC-1 核心蛋白质部分，在肿瘤黏蛋白中暴露。这些暴露的表位对肿瘤都是专一性的，使其成为免疫治疗的良好靶标。即使糖基转移酶活性只有轻微的变化，在这种情况下，靶向表位也能高度地局限在肿瘤细胞。

有关黏蛋白参见 **3.1** 节。

广泛用于癌生物标志的检测方法也可以检测糖蛋白。例如，检测前列腺癌的前列腺特异性抗原和检测结肠癌的癌胚抗原，但这些方法不是基于糖基化的变化。糖蛋白组学和糖组学新技术正用于鉴定以聚糖特异变化为基础，可以提供癌症早期灵敏检测生物标志的方法。策略之一是剖析存在特异抗糖抗体的血清，这些抗糖抗体可以产生出现在免疫系统之外的特异性抗肿瘤聚糖。这种剖析研究可以利用聚糖阵列测试聚糖库的结合抗

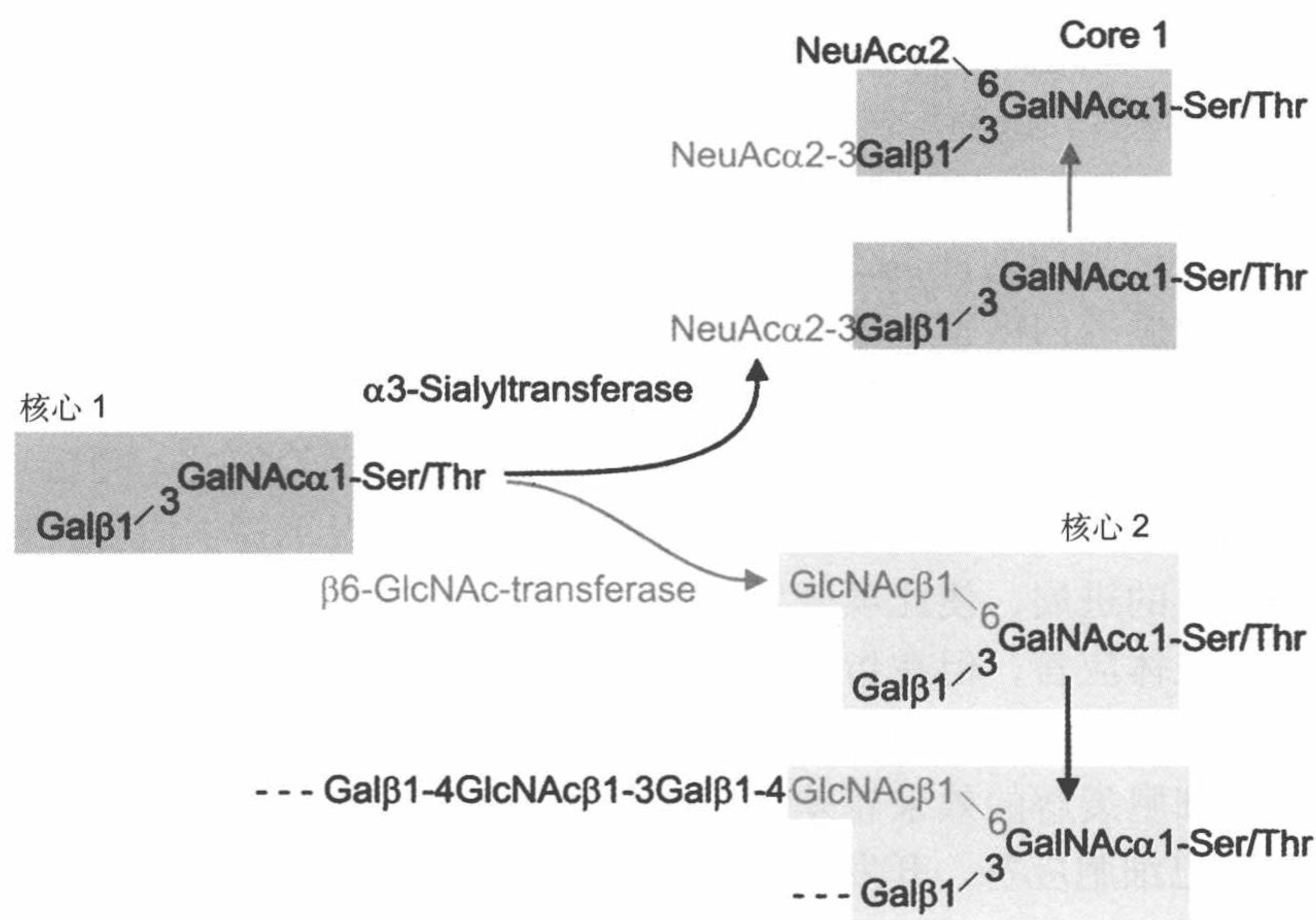


图 13.10　唾液酸基和 GlcNAc- 转移酶在 O- 连接聚糖合成过程中的竞争。核心 1 结构上添加 β1-3 连接的 GlcNAc，形成可以进一步延伸的核心 2 结构。添加 α2-6 连接的唾液酸，可以阻止 GlcNAc- 转移酶的作用，因此，形成的最大结构为二唾液酸化核心 1 结构

➡有关聚糖阵列参见 6.7 节。

体，和具有在糖蛋白结构中出现的糖肽，如已知与癌症相关糖基化变化的 MUC-1。利用这一技术，已从患有卵巢癌、乳腺癌和前列腺癌的患者血清中检测出与 MUC-1 与癌症相关的 IgG 抗体。这些抗体可抗含有唾液酸化 -Tn、Tn 或截短核心 3 聚糖 MUC-1 的三种不同的 O- 糖肽表位。这些初步发现极大地促进着未来开发以糖基化变化为基础的癌症检测方法。

小　结

证实糖基化变化对病因有直接的作用仍然是一种挑战。在这一章和本书的其他部分讨论的糖基化变化举例表明与聚糖生物合成途径和识别系统突变有关的遗传性疾病，可以对聚糖及其受体介导的生物过程提供重要见解。但在很多情况下，由这类突变引发的一些变化可能是微妙和出乎意料的。对血管性血友

病（von Willebrand disease）的分子基础分析证实，在这种病中糖基化的作用只在合适的遗传连锁图谱建立后，才越来越明显。目前正在建立与疾病和疾病易感性有关的大量多态性图谱。我们对鉴定编码糖缀合物生物合成、运输、降解和识别过程中功能蛋白质基因能力的提高，毫无疑问会进一步促进建立聚糖与疾病过程之间的联系。聚糖及其受体的变化方式，在细胞、组织和生物生理不同层面引发功能障碍方面的知识，也可能对治疗干预指出一条有效的途径。

主要参考文献

Barresi, R. and Campbell. K. P. (2003). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease, *Journal of Cell Science* **119**, 199-207. 本篇论文和由 Schachter 等 (2004)(见下) 发表的文章总结了肌营养不良蛋白聚糖的遗传学和生物化学。

Brockhausen, l. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 67-95. 详细评论了不同类型癌症中 O- 连接聚糖生物合成如何改变。

Bucala, R. and Cerami, A. (1992). Advanced glycosylation: chemistry. biology and implications for diabetes and aging, *Advances in Pharmacology* **23**. 1-34. 论述糖化作用。

Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren. C. E. (1999). Glycoprotein gtycosylation and cancer progression, *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 21-34. N- 连接聚糖 1-6 臂增加支链可促进癌症发展。

Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren, C. E. (1999). Protein glycosylation in development and disease, *BioEssays* **21**, 412-421. 这是一篇对健康和疾病蛋白质糖基化很好的评论文章。

Freeze, H. H. and Westphal, V. (2001). Balancing N-linked glycosylation to avoid disease, *Biochimie* **83**. 791-799. 这是一篇评论先天性糖基化疾病的文章，并推测 N- 连接糖基化途径中突变的可能性优势选择。

Kim, Y. J. and Varki, A. (1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Glycoconjugate Journal* **14**. 569-576. 这篇论文详细说明了癌症中所见不同糖基化改变并推测这些糖基化变化可能与引发肿瘤和促发肿瘤有关。

Macher, B. A. and Galili, U. (2008). The Galαl-3Galβl-4GlcNAc-R(α-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance, *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**, 75-88. 论文评论了 α- 半乳糖表位的特性，识别它的抗体，和这一相互作用如何造成异种移植物的排斥。

Mohlke, K.L., Purkayastha, A. A., Westrick, R. J., Smith, P.L., Petryniak, B., Lowe, J. B., and Ginsburg, D. (1999). Mvwf, a dominant modifier of murine

von Willebrand factor,results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase, *Cell* **96**, 111-120. 说明一种 GalNAc 转移酶错表达造成冯·维勒布兰德因子缺乏的实验。

Rich, J.R. and Withers, S. G. (2009). Emerging methods for the production of homogeneous humanglycoproteins, *Nature Chemical Biology* **5**, 206-215. 论文总结了某些正在研发的用酶重构细胞和聚糖糖基化工程的方法。

Schachter, H. (2001). Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 1085-1104. 文章包括对缺陷性蛋白 N- 糖基化先天性疾病的详细评论。

Schachter, H., Vajsar, J., and Zhang, W.(2004). The role of defective glycosylation in congenital muscular dystrophy, *Glycoconjugate Journal* **20**, 291-300. 参见 Barresi 和 Campbell (2003)(见上)发表的文章。

Tretter, V., Altmann, F., Kubetka, V., Marz, L., and Becker, W. M. (1993). Fucose α1, 3 linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals, *International Archives of Allergy and Immunology* **102**, 259-266. 界定 α1-3 连接的岩藻糖作为蜂蜇过敏反应的实验。

Wandall, H.H., Btixt, O., Tarp, M. A., Pederson, J. W., Bennett. E. R, Mandel, U., Ragupathi, G., Livingston, P.O., Hollingsworth, M. A., Taytor-Papadimitriou, J., Burchell, J., and Clausen, H. (2010). Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes, *Cancer Research* **70**, 1306-1313. 这篇论文论述了 O- 连接糖肽鉴定癌症相关抗糖抗体聚糖阵列的制备和筛选。

Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Statnaker, S. H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M.,Oldstone, M. B. A., Schachter, H., Wells, L., and Campbell, K. P.(2010). O-Mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding, *Science* **327**, 88-92. 一个惊喜地发现在肌营养不良蛋白聚糖的 O- 甘露糖连接的聚糖中存在的磷酸二酯连键有助于阐释先天性肌营养不良症的特征。

习 题

13.1 说明自然发生的基因突变导致聚糖合成或识别过程改变的不同方式。由这种突变产生的表型，怎样为寡糖功能提供证明？

13.2 描述用于界定先天性糖基化疾患的实验类型。

参考文献：Kim, S., Westphal, V., Srikrishna G., Mehta, D.P., Peterson, S., Filiano, J., Karnes, P.S., Patterson, M.C., and Freeze, H.H. (2000). Dolichol phosphate mannose syn-thase (DPM1) mutations define congenital orders of glycosylation

le (CDG-le), *Journal of Clinical investigation* **105**, 191-198.

Burda, P., Borsig, L., de Rijk-van Andel, J., Wevers, R., Jaeken, J., Carchon, H., Berger, E.G., and Aebi, M. (1998). A novel carbohydrate-deficient syndrome characterized by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide, *Journal of Clinical Investigation* **102**, 647-652.

13.3 讨论疾病中抗糖抗体的参与。

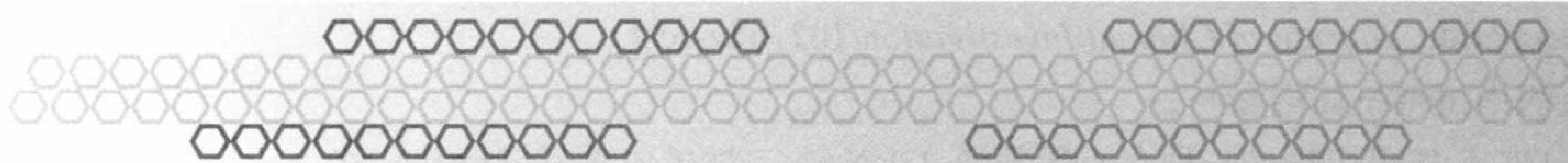
13.4 评价 *LARGE* 基因产物是一种合成葡萄糖 -GlcNAc 二糖单位重复链糖基转移酶的间接证明。

参考文献：Patnaik, S.K. and Stanley, P. (2005). Mouse LARGE can modify complex N- and mucin O-glycans on α-dystroglycan to induce laminin binding, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 20851-20859.

13.5 描述用于表明肿瘤细胞上 MUC-1 的聚糖结构变化与糖基转移酶活性变化有关的各种实验。

参考文献：Dalziel, M., Whitehouse, C., McFarlane, I., Brockhausen, I., Gschmeiss-ner S., Schwientek, T., Clausen, H., Burchell, J.M. and Taylor-Papadimitriou, J. (2001). The rela-tive activities of the C2GnT1 and ST3Gal-1 glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1, *Jourmal of Biological Chemistry* **276**, 11007-11015.

14 糖生物学发展前景



学习目的

学习本章后应知内容

1. 证实聚糖在特定生物过程中重要性所需的各种证据
2. 开展小规模糖组学研究的重要性，以及分析表达和糖组学数据所需的新方法
3. 基因组学和新型遗传技术，对我们了解聚糖合成和识别的影响

本书前面章节主要描述了聚糖可行使的功能。虽然也介绍了其他一些范例，但主要还是阐释聚糖分子在糖蛋白结构、运输及其介导的、细胞黏附和信号传送方面作用。但是，在“糖基化有什么功能？”这种一般性问题得到解答后，如何回答“特定糖缀合物上特异聚糖具有什么功能？”这种专一性的问题，将成为未来大量研究工作的基础。在这一章中将提出回答这类问题的几种方法。

14.1 聚糖功能需由生物化学、细胞生物学和遗传学联合界定

本书前面章节中讨论的聚糖功能举例，只是一部分已建立了生物功能的代表性糖和受体。选取的案例也是一些我们已知的聚糖结构和它们是如何被识别的。例如，选凝素分子，一种研究最清楚的案例，我们已从基因敲除小鼠获得遗传证据，证明这种蛋白质在正确炎症应答中所发挥的重要作用，以及对选凝素与其选择聚糖相互作用的生化基础和它们所能介导的细胞间的相互作用都有了详细的了解。通过对形成正确糖配体所需酶的基因分析和靶细胞上配体结构特征的研究，使得对上述信息的了解更加完善。结合这些研究，我们对选凝素和聚糖配体的生理学作用才有了正确的了解，尽管这些研究还有待进一步完善。

然而选凝素仅是个非典型的例子，因为我们了解的细节和事实得到了

多方面证据的支持。在本书中讨论的多数其他例子，我们都至少同时有基因和生化方面的补充证据，但在有些案例中，聚糖和生理学过程之间的联系，只通过上述方法中的一种方法证明。因此，未来糖生物学研究将面临两方面的挑战：一方面需要继续采用生化和基因方法提供聚糖作用的信息；另一方面还要把多种研究路线集中在一起，为聚糖 - 受体相互作用提供令人信服的证据（图 14.1）。

14.2　糖组学和系统糖生物学加深了我们对糖生物学的理解

与细胞中特异糖蛋白最终结合的聚糖在接纳体蛋白质和细胞表达的糖基转移酶补体之间可以产生复杂的相互作用。理论上，全面描述细胞中表达的糖基转移酶模式，结合对各转移酶生化特征的详尽了解可以让我们预测将要合成怎样的聚糖。利用系统生物学计算方法与现有数据可以建立聚糖组分析结果与糖基转移酶表达谱基因组分析结果之间的相关性，从而获

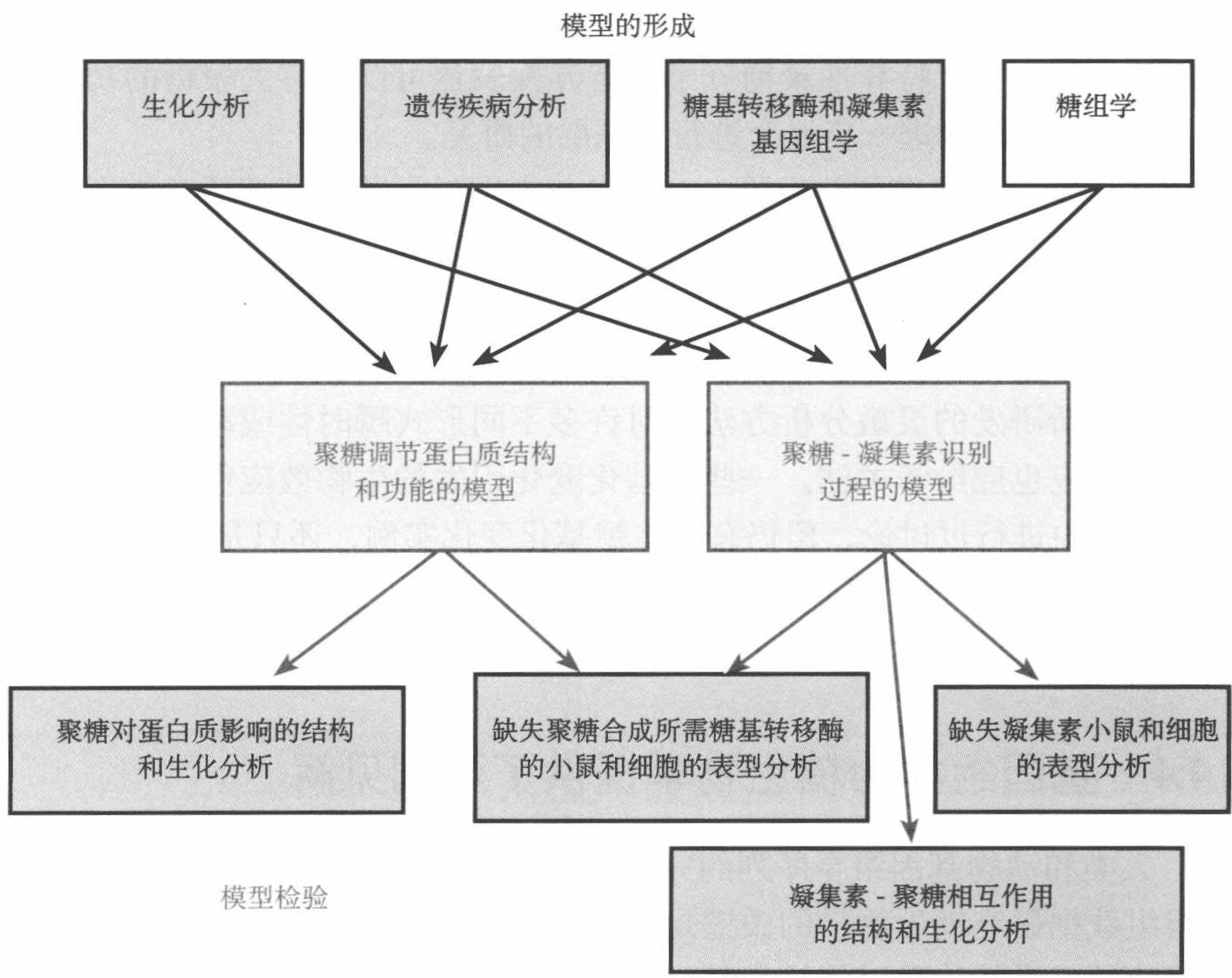


图 14.1　有关聚糖和凝集素功能构想的来源

得不同层面的预测能力。需要不断地积累这类可用的数据，特别是积累从野生型和缺失个别糖基转移酶基因敲除小鼠中分离细胞的对比数据，以改进和优化这种预测的演算方法。

14.3　糖基化在不同细胞和蛋白质中专一的特性造成巨大的技术挑战

由于糖基化反应发生在细胞内，因此理想的聚糖集合体与糖基转移酶表达谱之间的相互联系，应该建立在不同的分化细胞类型上。对这类研究所需的分析方法应适合更小型和更均一的细胞群落，而且方法的总处理能力也应不断提高。转录物组和糖组这类的研究，最适合通过相对简易的方法，如在细胞分拣中分离的细胞上应用，这意味着免疫系统细胞将成为这些研究工作的起始靶标。另外，还应有更多的定性方法，继续用于含有多种细胞类型的实质组织。在这些案例中，凝集素和抗糖抗体可用于定位特定的聚糖分子，利用基因特异性探针进行原位杂交，用于鉴定表达特异性糖基转移酶的细胞。这些方法可用于追踪在细胞分化和生物发育过程中发生的糖基化变化。特异性聚糖分子的特异性表达可以为有关聚糖的功能提供重要信息，从而进一步逐个进行更深层的研究。

从选凝素系统得到的经验之一是参与识别过程的靶聚糖通常是聚糖总集合体中较小的组分，如重要的唾液酸-Lewis^{x}结构只出现在P-选凝素糖蛋白配体1上单一位点。在这些案例中，挑战在于如何确定这一关键性位点和分析与其相关的聚糖类型。这类研究将继续依赖于生化方法，但也必将受益于新研发的灵敏分析方法。对许多不同形式瞬时性或动态性特征的糖基化反应也应给予关注。一些糖基化变化引发的生物效应例子，已在之前的章节中进行过讨论。但仍有很多糖基化变化实例，还只是初见端倪。

14.4　基因组学为糖生物学提供了深刻见解

人类和动物基因组全序列的完成为糖生物学研究提供了新方法。通过基因组数据研究糖生物学的关键是鉴定编码糖基转移酶和凝集素的基因。转移酶的三维结构和以结构为基础的序列对比，可为鉴定新转移酶提供所

需的信息，而且可能使我们了解几乎人类和其他生物转移酶的全部补体系统。但是，有必要深入分析转移酶表达形式的活性，为进一步界定聚糖合成中每一种酶的作用。由于转移酶总数不是很多，研究任务虽然巨大，计划实现还是可行的。正如前面章节中描述的，了解转移酶家族的专一性是分析细胞和生物中糖基化反应不可或缺的重要补充。

考虑到聚糖上具有大量精细末端结构，可以想象到相应地同样会有大量与不同聚糖相互作用的受体。然而基因组学分析表明，凝集素 - 聚糖相互作用的实际数目不是很大。用于鉴定糖识别域家族的序列模体经常鉴定出具有相同折叠，但缺乏糖结合活性的凝集素样结构域，因此，评定真实的糖结合蛋白需具备糖识别域如何与聚糖相互作用的知识。糖结合活性已在不同结构背景下经过多次进化，因此，介导主要生物过程的凝集素，在以已知凝集素家族结构为基础的基因组筛选中，可以无法被鉴定出来。案例中举出的遗传证据可以指明聚糖识别的关键作用，但不能鉴定当时该处的相关受体，表明可能还有另类糖结合受体有待识别。鉴定这类凝集素需要新型对策。特别是在发育过程情况下，可能只有数量很小的细胞参与特异的相互作用，基因分析对鉴定随后能够以生化方法研究的潜在受体非常关键。

随着越来越多的凝集素被发现，界定凝集素的识别性能和它们介导的，诸如运输、黏附和信号传送等细胞功能，变得非常重要。聚糖阵列分析系统的出现，已成为分析鉴定糖结合受体强有力的工具。还有一些需要继续研究的技术创新，如使聚糖能在横向流动类膜结构中展现的技术。但目前的主要任务是尽可能使聚糖补体综合性地出现在阵列分析系统中，使阵列分析应用范围从哺乳动物聚糖扩展到能在细菌和真菌糖类中应用，促进受体与病原体和哺乳动物靶聚糖结合。

14.5 传统的遗传学应结合人类遗传学新方法了解聚糖及其受体

包括随机诱变、定向诱变和多态性分析在内的遗传学研究将继续作为获取聚糖及其受体功能信息的重要方法。正如前面讨论的许多例证，对缺失特定类型聚糖或凝集素基因敲除小鼠的表型分析可以提供大量有关聚糖 - 受体相互作用生理学功能的重要见解。可以肯定的是这一方法将继续作为了解聚糖体内功能的主要途径之一。目前已有许多与糖生物学相关的

敲除小鼠，而且制定了涵盖整个小鼠基因组一系列全面敲除的实验计划。主要的挑战是从这些小鼠的表型分析中能够了解到聚糖如何起作用。

绘制与人类疾病相关的突变图谱，也是聚糖功能信息的重要来源，除前面章节中讨论的疾病外，通过这种方式还确定了另一些与糖基化有关的疾病，虽然多数案例中糖基化正常功能和机能障碍机制还有待建立。当这些突变绘制成编码糖基转移酶、核苷酸糖转运体或凝集素基因图谱，就可以构建这些蛋白质在人类正常生物学中如何起作用和这些突变如何引发疾病的工作模型。一大批可利用的有关遗传变异的信息，可以为生化功能中微妙变化与某些疾病易感性相关的生理变化之间增加重要的相关联系。糖结合受体的基因分析表明，影响这些蛋白质活性的多态性现象比较普遍。在某些情况下，小鼠缺乏某些人类生物合成酶和聚糖结合受体的同源基因，此时人类的基因数据对建立种间专一性糖基化功能至关重要。

通过随机诱变后，选择特异表型，也可能从中获得有关聚糖功能的信息。一般情况下是在简单的模式生物中进行这种诱变研究。在所有生物界，聚糖都具有结构性功能，而且其在蛋白质折叠、胞内运输中的功能在真核生物进化早期就已经出现。因此，分泌途径中的凝集素，可以在酵母中进行研究，但是，起细胞黏附受体作用的聚糖和凝集素则必须在较为复杂的生物中研究。像斑马鱼、果蝇和线虫这类模式生物对发育方面的研究，具有明显的优势。但是，重要的是要铭记在动物界，脊椎和无脊椎动物中的聚糖有着实质性的区别。由此，模式生物可以继续提供聚糖所能行使的各类功能的信息，但是，个别聚糖对特定生物的作用，有时则是专一性的。

14.6 了解聚糖的分子功能，需进一步阐明结构与功能之间的关系

糖生物学研究中的一个发展中的重要目标是阐明聚糖的结构及其物理性能如何使其适合于行使独特功能。聚糖和受体相互作用的结构研究将形成某些细胞识别过程为什么包括蛋白质和糖类相互作用，而且更多的反应过程还包括蛋白质之间相互作用这些广泛问题的基础。有些最具特征的聚糖 - 凝集素复合体还参与动态相互作用，如选凝素介导的白细胞滚动作用。蛋白质与糖类相互作用的物理特性可能在这些案例中特别有利。普遍认为，可以从中了解到合成聚糖的酶是如何以一种特殊关系与识别这些聚糖的凝集素协同进化的。

14.7 利用增长的糖生物学知识解决实际问题

在本书几处加框中突出地介绍了依据聚糖结构和功能方面的知识，在生物工程中应用糖生物学制备糖类治疗药物。未来可以预见，在聚糖合成和加工特定步骤中，作为调节疾病中聚糖活性的小分子抑制剂的快速发展。另外，当工程酵母和细菌表达系统领域进入新时期，制备医用重组糖蛋白的新技术正取得飞速发展。随着受体介导的糖蛋白运输方面的知识越来越丰富，很可能出现利用特异性末端糖残基使糖蛋白靶向表达正确受体特异组织的新方式。

小 结

对聚糖功能我们虽然有很多认同，但是还有许多聚糖功能有待发掘。从聚糖和凝集素结构分析到基因敲除小鼠生理学等一系列研究方法都将继续对这些聚糖功能提供信服的证据。当我们对糖生物学的认知拓宽包括更多例证时，毫无疑问，在疾病诊断和治疗中，将发现聚糖功能知识应用的新途径。

ABO blood group substances: ABO 血型物质　再结合膜蛋白和分泌蛋白质上出现的决定个体血型的糖结构。个体可能含有 A、B，或 A 和 B 这两种抗原物质，或者不含这类物质（O 型血）。

Adaptive immunity：适应性免疫　亦称获得性免疫 (acquired immunity)。是由特异抗原刺激机体产生的免疫应答。

Adhesin：黏附蛋白　一种在微生物表面发现的蛋白质，这种蛋白质与宿主细胞表面的配体结合。

Advanced glycation end products (AGE)：渐进性糖化终产物 (AGE)　蛋白质中高浓度葡萄糖与氨基酸侧链反应的产物。

Aggrecan：聚集蛋白聚糖　主要出现在软骨中的硫酸软骨素 / 硫酸角质素蛋白聚糖，含有 100 多个与蛋白质核心结合的的糖胺聚糖链。

Anomer：异头物　一对立体异构体中之一，两立体异构体的构型仅在异头物碳原子上有所区别。

Anomeric carbon：异头物碳　在单糖形成环状结构时，异头物碳是新形成的手性中心。

Anomeric configuration：异头物构型　异头物碳的构型，即 α 或 β 构型。

Asialoglycoprotein receptor：无唾液酸糖蛋白受体　一种结合半乳糖的 C- 型凝集素，参与肝脏对循环系统糖蛋白的清除。在肝细胞上发现的这种受体，与末端为半乳糖或 GalNAc 残基的糖缀合物结合，并介导肝细胞胞吞。

Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr：蛋白质中须与 N- 连接寡糖结合的序列。这些寡糖与天冬酰胺残基的酰胺态氮连接。X 可以是除脯氨酸以外的任何氨基酸。

Bi-antennary: 二天线　具有两条天线。借用接受外来信息的天线描述通过在三甘露糖核心的 1-6 和 1-3 两分支上添加糖链，形成 N- 连接复合寡糖。亦称双触角的。

Biomarker：生物标志　用于在生物化合物层面分析、检测机体变化和过程的标志物，这种标志物可能与病情和疾病的进行性有关。

Calnexin：钙连蛋白　一种内质网膜结合蛋白，其腔内结构域，与新合成糖蛋白连接 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 寡糖的末端葡萄糖残基结合。当其折叠时，糖蛋白仍保留在内质网内。

Calreticulin：钙网蛋白　一种内质网腔内与钙连蛋白为同源物的可溶性蛋白质。同样，也与新合成糖蛋白连接 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 寡糖的末端葡萄糖残基结合，并参与防止错折叠蛋白质脱离内质网的质量控制过程。

Carbohydrate-recognition domain (CRD)：糖识别域 (CRD)　含有糖结合位点的结合聚糖蛋白（凝集素）的一部分。依据糖识别域序列的相似性，凝集素可分成不同的家族。

Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor(CD-MPR)：阳离子依赖型甘露糖 6- 磷酸受体 (CD-MPR)　需要从高尔基体将溶酶体酶导向溶酶体的两种结构相关的小型受体。为了使结合酶上的聚糖与甘露糖 6- 磷酸残基结合，CD-MPR 需要二价的阳离子。

Cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR): 阳离子非依赖型甘露糖 6- 磷酸受体　需要

从高尔基体将溶酶体酶导向溶酶体的两结构相关的大型受体。为使结合酶上的聚糖与甘露糖 6- 磷酸残基结合，CI-MPR 不需要阳离子。

CD2：也称作 LFA-2。一种在 T 细胞表面发现的免疫球蛋白超家族的穿膜蛋白质。CD2 具有介导 T 细胞和靶细胞之间免疫应答部分黏附作用黏附分子的功能。

CD22：在 B 淋巴细胞上发现的一种结合唾液酸的蛋白质。是涎免凝素家族中的 I- 型凝集素。

CD34：一种在淋巴细胞黏附过程中作为 L- 选凝素的配体，表达内皮细胞和造血干细胞上的穿膜糖蛋白。CD34 是用与黏蛋白样结构域连接的 O- 连接聚糖高度糖基化的糖蛋白。

Ceramide: 脑酰胺　最简单的一类鞘脂，由酰胺连键与氨基醇鞘氨醇连接的脂肪酸链组成。脑酰胺是鞘糖脂的脂质组分。通过脑酰胺 1- 羟基，可以与 β 连键结合一个或多个糖残基。

Chondroitin sulphate: 硫酸软骨素　出现在软骨、骨骼和皮肤蛋白聚糖上的糖胺聚糖。由葡糖醛酸和 *N*- 乙酰半乳糖胺重复二糖单位组成。

Chorionic gonadotropin: 绒毛膜促性腺激素　人胎盘分泌的一种激素。刺激卵巢产生对维护妊娠非常重要的孕酮。绒毛膜促性腺激素在结构上与促滤泡素和促黄体素相关，具有完全相同的 α 亚基，但 β 亚基则是独有的。

Collectin receptor: 胶原凝素受体　与胶原凝素分子胶原区结合的一种受体，介导胶原凝素与其配体的内化和破坏作用。

Collectins：胶原凝素　一组可溶性 C- 型凝集素，由结合胶原样结构域的 C- 型糖识别域组成。血清甘露糖结合蛋白质和肺表面活性蛋白质 A 和 D 是这类凝集素的代表性实例。胶原凝素启动抗微生物的先天性免疫应答。

Complement pathway：补体途径　作为免疫应答的一部分，一组导致杀死微生物的血清蛋白质的级联反应。经典途径通过蛋白质 C1q 与结合病原体抗体的结合启动，而凝集素分支补体途径的启动，则是通过结合甘露糖的蛋白质与病原体表面上的糖链结合。

Complex oligosaccharide/glycan：复合寡糖 / 聚糖　通过在高尔基体内三甘露糖核心上，添加如 GlcNAc、半乳糖和唾液酸形成的一种 N- 连接寡糖。

Concanavalin A (Con A)：伴刀豆球蛋白 A　从刀豆中分离的一种植物（豆科）凝集素，以 4 个相同的亚基四聚体形式存在，每个亚基都含有一个结合甘露糖和葡萄糖的特异性位点。

Congenital disorders of glycosylation (CDG)：先天性糖基化疾病　因参与寡糖生物合成的酶或转运体蛋白质的失常，出现糖蛋白糖基化不足的一组遗传性疾病。

C-type CRD：C- 型糖识别域　C- 型凝集素特征性的钙依赖性糖结构域。

C-type lectin-like domain：C- 型凝集素样结构域　与 C - 型凝集素的 C- 型糖识别域同源的结构域，具有相同的折叠，但失去了一些或全部连接糖和（或）钙的残基。

C-type lectins：C- 型凝集素　一组存在于动物中结合聚糖的蛋白质（凝集素），以钙依赖性方式与糖结合。这类凝集素的特征是具有保守系列氨基酸糖识别域，其中有些形成整体折叠，另一些与糖和钙结合。选凝素细胞黏附分子、血清甘露糖结合蛋白质和无唾液酸糖蛋白受体属于这类凝集素。

DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non-integrin)：树突细胞特异性细胞间黏附分子 -3 结合的非整合素　树突细胞上发现的一种与膜结合的甘露糖连接的 C- 型凝集素，参与介导树突细胞和 T 淋巴细胞，以及树突细胞与致病性微生物之间的相互作用。

DC-SIGNR （DC-SIGN-related protein）：DC-SIGN 相关蛋白质　也称作 L-SIGN。一种与膜结合的甘露糖 C- 型凝集素，结构和序列类似于 DC-SIGN。存在于内皮细胞。

Decay-accelerating factor (DAF，CD55)：蜕变加速因子　一

种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚固的膜蛋白质，可调节补体激活，防止补体损伤自身组织细胞。

Dermatan sulphate：硫酸皮肤素　存在于皮肤和血管蛋白聚糖上的一种特异性硫酸软骨素糖胺聚糖。由艾杜糖醛酸或葡糖醛酸和 *N*- 乙酰半乳糖胺重复二糖单位组成。

Diacylglycerol：二酰甘油　取代 1 和 2 位羟基的长链脂肪酸甘油，磷脂酰磷脂生物合成的中间体。

Dolichol：多萜醇　具有 15-19 类异戊二烯单位和末端为磷酸化羟基异戊二烯脂。在糖蛋白和糖脂合成过程中，多萜醇对糖链起膜结合载体的作用。

Enantiomer：对映体　两镜像之一形成具有一个或多个手性中心分子。

Endoglycan：内聚糖　淋巴细胞黏附过程中，在内皮细胞和造血干细胞上作为 L- 选凝素配体表达的黏蛋白样穿膜糖蛋白。其结构与 CD34 相关。

Endoglycosidase：内切糖苷酶　可以水解寡糖或多糖内部糖苷键的酶。例如，内切糖苷酶 H 可以裂解高甘露寡糖和某些杂合寡糖核心中两 GlcNAc 残基之间的连键。

Endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD)：内质网相关蛋白质降解　错折叠蛋白质越过内质网膜易位返回，并通过蛋白酶体靶向降解的过程。

Endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)：内质网 - 高尔基体中间区室　参与蛋白质从内质网运输的动态膜区室。

Epidermal growth factor receptor：表皮生长因子受体　指与表皮生长因子结合的细胞表面受体。这种受体是在胞质区含有酪氨酸激酶结构域的二聚体。与受体胞外区表皮生长因子的结合，造成胞内酪氨酸激酶结构域的激活，触发刺激细胞生长的信号传送级联反应。

Epimer: 差向异构体　关于像糖这样的单一不对称中心化合物，形成两种构型不同的非对映的异构体。例如，甘露糖是葡萄糖 C-2 的差向异构体，半乳糖是葡萄糖 C-4 的差向异构体。

Epimerization：差向异构化　化合物中单一手性中心的构型被倒置为相反构型的过程。

ERGIC-53：参与内质网 - 高尔基体中间区室 (ERGIC) 糖蛋白运输的一种结合甘露糖的 L- 型凝集素。

Erythropoietin：红细胞生成素　刺激红细胞生成肾分泌的一种激素。

E-selectin：E- 选凝素　一种由内皮细胞表达的选凝素细胞黏附分子。E- 选凝素介导内皮发炎部位白细胞的黏附作用。

E-selectin ligand 1(ESL-1)：E- 选凝素配体 1　白细胞黏附于内皮发炎部位时，一种结合 E- 选凝素的白细胞穿膜糖蛋白。ESL-1 具有被 E- 选凝素识别、末端为唾液酸化路易斯 ^{x} 基团的 N- 连接寡糖。

Exoanomeric effect：外 - 端基异构效应　影响首选糖构象的电子现象。

Exocyclic：环外的　化学环状结构的外环。

Exoglycosidase：外切糖苷酶　通过糖苷键的水解，从寡糖或多糖的非还原 (外) 端释放单糖的酶。

Fabry disease：法布里病　一种糖脂贮积症，催化酰基鞘氨醇三己糖 (globotriaosylceramide) 降解反应的 α- 半乳糖苷酶 A 失常是这种病的病因。

Fibroblast growth factor：成纤维细胞生长因子　刺激多种细胞生长的蛋白质家族之一。信号传送过程中与作为成纤维细胞生长因子共受体的蛋白聚糖硫酸乙酰肝素链结合。

Follitropin: 促滤泡素　又称促滤泡激素 (FSH)，是由垂体前叶分泌的促性腺激素，刺激卵巢中滤泡成熟和分泌雌激素。促滤泡素在结构上与促黄体素、绒毛膜促性腺素相关，具有相同的 α 亚基，但 β 亚基是独有的。

Functional glycomics：功能糖组学　结合聚糖结构分析，阐明细胞和生物体的聚糖功能，研究糖基化生物功能的学科。

Galactosphingolipid：半乳糖神经鞘脂　半乳糖作为首例糖与脑酰胺结合的一类鞘糖脂。

Galactosyltransferase：半乳糖基转移酶　合成糖蛋白和糖脂的过程中，从活性 GDP- 半乳糖供体转移半乳糖到接纳体寡糖的酶。

Galactin：半乳凝素　结合含有 β- 连接半乳糖配体的一组可溶性动物凝集素。具有调节细胞黏附和通过细胞表面聚糖交联的信号传送功能。

Ganglioside：神经节苷脂　最初从脑中分离的一种鞘糖脂，最少有三个糖残基与脑酰胺结合，结合在最外面的是唾液酸残基。

Gaucher disease：戈谢病　因缺乏催化葡糖脑酰胺降解所需 β- 葡糖脑苷脂酶而引发的一种糖脂贮积病。

GlcNAc-transferase Ⅰ：GlcNAc- 转移酶 Ⅰ　高尔基体内侧的一种酶。在 N- 连接糖基化途径中，可以从 UDP-GlcNAc 将 GlcNAc 转移到含有 5 甘露糖残基核心寡糖 1-3 分支上甘露糖残基的酶。这一反应是形成复合或杂合寡糖反应的开始步骤。

Globoside：红细胞糖苷脂　一种以核心结构 GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc 为基础的鞘糖脂。

Glucopyranose：吡喃型葡萄糖　含有吡喃环（5 碳原子和 1 氧原子环）的环形葡萄糖。

Glucosidase Ⅰ：葡糖苷酶 Ⅰ　N- 连接寡糖生物合成过程中，从 Glc3Man9GlcNAc2 清除结合在 α1-2 末端的葡萄糖残基的酶。

Glucosidase Ⅱ：葡糖苷酶 Ⅱ　N- 连接寡糖生物合成过程中，葡萄糖苷酶 Ⅰ之后，在葡萄糖残基 α1-3 连键上起作用的酶。

Glucosphingolipid：葡糖神经鞘脂　葡萄糖作为首例糖与脑酰胺连接的一类鞘糖脂。

Glycan：聚糖　出现在糖蛋白和糖脂上糖链的总称。

Glycan array：聚糖阵列　一种固定化的聚糖测试面板，用于探测结合聚糖的蛋白质，确定其结合的专一性。

Glycation：糖化　非酶催化反应中，例如还原糖葡萄糖与蛋白质的结合过程。糖尿病人体内因血糖偏高，使一些蛋白质发生失控的糖化反应。

Glycocalyx：糖萼　突出细胞表面的聚糖网络。

Glycoconjugate：糖缀合物　结合有糖链的蛋白质和脂质。

Glycoform：糖形　糖蛋白糖基化的不同形式。糖蛋白的糖形具有相同的蛋白质序列，但因连接寡糖的数目和 / 或结构不同，区别为不同糖形。

Glycolipid：糖脂　连接一个或多个糖残基的脂质。

Glycome：糖组　出现在细胞、组织或生物体中聚糖的总补体系统。

Glycophorin A：血型糖蛋白 A　红细胞表面出现的主要穿膜蛋白质。其胞外区含有多个 O- 连接聚糖的结合位点。

Glycophospholipid：糖基磷脂　磷脂酰甘油核心与一个或多个糖链连接形成的糖脂。

Glycoprotein：糖蛋白　含有作为共翻译或翻译后修饰的共价连接糖分子的蛋白质。

Glycosaminoglycan：糖胺聚糖　由含有己糖和氨基醇衍生物的重复二糖单位组成的无分支长链多糖分子。由于硫酸基和糖醛酸基团的存在，糖胺聚糖都带有负电荷。糖胺聚糖组成蛋白聚糖的聚糖部分。

Glycosidase：糖苷酶　水解糖苷键的酶。

Glycosidic linkage：糖苷键　连接二糖、寡糖和多糖中单糖的键。通过两单糖中各有羟基的缩合反应，形成糖苷键。

Glycosphingolipid：鞘糖脂　由脑酰胺与一个或多个糖残基结合形成的糖脂。

Glycosylated cell adhesion molecule 1(GlyCAM-1)：糖基化细胞黏附分子 -1　一种含有多个由内皮细胞分泌的 O- 连接聚糖黏蛋白样蛋白质，与外周淋巴结高内皮细胞小静脉质膜缔合，并在淋巴细胞归巢过程中作为 L- 选凝素的配体。

Glycosylation engineering：糖基化工程　糖基化工程主要研究生物合成或体外重构过程中，产生糖基化改变和新界定糖蛋白的过程。

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor: 糖基磷脂酰肌

醇 (GPI) 锚　质膜上结合蛋白质的糖脂分子。磷脂酰肌醇基团通过几个糖残基与蛋白质 C- 末端结合的磷酰基乙醇胺组成 GPI 锚。磷脂酰肌醇基团的两个脂肪酸链将蛋白质锚定在膜上。

Glycosyltransferase：糖基转移酶　从供体分子催化转移糖与受体分子形成糖苷连接的酶。

Glypicans：磷脂酰基醇蛋白聚糖　通过糖基磷脂酰基醇锚，与细胞表面硫酸乙酰肝素结合的蛋白聚糖家族，控制多数组织生长因子的信号传送。

Hexose：己糖　6 碳原子的单糖。

High-mannose oligosaccharide/glycan：高甘露糖型寡糖 / 聚糖　一种由连接两个 *N*- 乙酰葡糖胺残基的 5-9 个甘露糖残基组成的 N- 连接寡糖。在 N- 连接糖基化途径中，通过从添加到蛋白质的 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 前体寡糖清除葡萄糖和甘露糖残基，形成这种寡糖。

Hyaluronic acid：透明质酸　在胞外基质中发现的一种葡糖醛酸和 *N*- 乙酰葡糖胺重复二糖单位的多聚体，具有很高的分子量。

I-cell disease：I- 细胞病　一种溶酶体贮积失调症，亦称黏脂贮积症 Ⅱ 型。这种病的起因是因为缺失了溶酶体酶添加甘露糖 6- 磷酸所需的 *N*- 乙酰葡糖胺磷酸转移酶。

Immunodeficiency：免疫缺陷　部分免疫系统有些成分不能正常发挥作用引发的疾病。产生对疾病的易感性。

Innate immunity：先天免疫　亦称为天然免疫，是组成机体抵御微生物、病原体的第一道防线，属于非特异性免疫。

Insulin-like growth factor Ⅱ：胰岛素样生长因子 Ⅱ　与胰岛素原序列相关的生长因子。主要在胚胎和胎儿组织中表达，并调控胎儿的生长发育。

Insulin receptor：胰岛素受体　结合胰岛素的细胞表面受体。整体组织和功能类似于表皮生长因子受体，但是，从受体向下游传送信号，刺激能量贮积和减少能量的调集。

I-type CRD：I- 型糖识别域　一种与免疫球蛋白样结构域为同源物的糖识别域。

I-type lectins：I- 型凝集素　含有与免疫球蛋白样结构域(I- 型糖识别域）同源糖识别域的聚糖结合蛋白（凝集素），例如，其中包括巨噬细胞上的唾液酸黏着蛋白、B 淋巴细胞的 CD22 和其他含有与唾液酸结合的免疫球蛋白样结构域的涎免凝素。

Keratan sulphate：硫酸角质素　存在于软骨、角膜和椎间盘中蛋白聚糖的一种糖胺聚糖。由半乳糖和 *N*- 乙酰葡糖胺重复二糖单位组成。

Kin recognition: 亲缘识别　催化糖基化相关反应步骤与糖基转移酶关联的联想。

α-Lactalbumin：α- 乳清蛋白　乳糖合成酶亚基之一的修饰蛋白质。

Lactose synthetase：乳糖合成酶　乳汁中的可溶性蛋白质，由催化合成二糖乳糖的半乳糖基转移酶和 α- 乳清蛋白组成。

Lectin：凝集素　结合聚糖的蛋白质。具有糖底物和糖结合抗体的酶，一般不归类为凝集素。

L-selectin：L- 选凝素　淋巴细胞上发现的选凝素细胞黏附分子。

L-type lectin：L- 型凝集素　与豆科植物凝集素在糖结合区具有同源糖识别域的聚糖结合蛋白质（凝集素）。例如，包括膜标志蛋白 ERGIC53 和整合性膜蛋白 VIP36 属于这类凝集素。

Lutropin: 促黄体素　也称促黄体激素 (LH)。垂体中分泌的一种激素。促黄体素刺激排卵，结构上与促滤胞素和绒毛膜促性腺素相关，具有相等的 α 亚基，但 β- 亚基则各不相同。

Leucocyte adhesion deficiency type Ⅱ (LAD- Ⅱ)：Ⅱ 型白细胞黏附缺陷症 (LAD- Ⅱ)　由携带岩藻糖基转移酶反应的供体糖，GDP- 岩藻糖，从细胞质进入高尔基体内转运体缺陷引发的一种罕见病。包括白细胞黏附反应所需选凝素配体在内的含有岩藻糖的这些寡糖，是不能合成的。

Lysin motif (LysM)：溶素模体 (LysM)　界定结构域家族

的序列模体，广泛分布在原核和真核生物，经常参与肽聚糖的结合反应。

Lysosomal storage disorder：溶酶体贮积失调症　任何溶酶体酶缺陷引发的遗传性疾病。例如在糖脂或多糖大分子溶酶体中的积聚而产生的症状，必须用缺失的酶将其分解。

Major histocompatibility complex（MHC）：主要组织相容性复合体（MHC）　由位于人第 6 号染色体上编码免疫系统具有重要作用多种蛋白质的一组基因。因最初在同种组织移植实验，确定移植是否被拒绝被发现而得名。

Mannose 6-phosphate receptors：甘露糖 6- 磷酸受体　有两种受体，即阳离子依赖型和阳离子非依赖型甘露糖 6- 磷酸受体，通过在酶的寡糖上结合甘露糖 6- 磷酸残基，可以从高尔基体将新合成的溶酶体酶，靶向溶酶体。

Mannose binding protein（MBP）：甘露糖结合蛋白 (MBP)　也称作甘露糖结合凝集素 (MBL)。在血清中发现的一种免疫应答中具有抗病原体的甘露糖结合的 C- 型凝集素。一种胶原凝素，经 C- 型糖识别域与微生物表面糖残基结合，通过胶原结构域与丝氨酸蛋白酶 (MASP) 的相互作用，可以介导补体激活。

Mannose receptor: 甘露糖受体　巨噬细胞和肝脏内皮细胞中发现的胞吞 C- 型凝集素，可以结合并介导具有末端甘露糖、*N*- 乙酰葡糖胺或岩藻糖糖缀合物的胞吞作用。

Mannosidase：甘露糖苷酶　从寡糖催化释放甘露糖的酶。

MBP-associated serine proteases (MASP)：MBP 相关丝氨酸蛋白酶 (MASP)　当 MBP 与微生物糖配体结合时，丝氨酸蛋白酶与甘露糖结合蛋白 (MBP) 结合，并被激活。活化的 MASP 启动激活配体系统的级联反应，导致激活的补体成分 C4 和 C2 杀死微生物。

M-type lectins：M- 型凝集素　与加工甘露糖苷酶具有同源糖识别域的聚糖结合蛋白 (凝集素)。这类凝集素中包括参与内质网蛋白质降解途径的 EDEM(内质网甘露糖苷酶 - I 样蛋白质)。

MUC-1: 黏液核心蛋白 1　上皮细胞上表达的主要穿膜黏蛋白。异常糖基化形式的这种黏蛋白则在人类肿瘤细胞，例如，在乳腺或卵巢癌上皮细胞表达。

MUC-2：黏液核心蛋白 2　存在于消化道、呼吸道以及其他黏膜性器官包被上皮的主要分泌性黏蛋白。

Mucine：黏蛋白　具有多个 O- 连接聚糖的大型、高度糖基化的蛋白质。黏蛋白多肽含有约 100 个富含丝氨酸和苏氨酸残基氨基酸与聚糖结合的重复区。有些黏蛋白与膜结合，但大多数黏蛋白是在黏膜表面分泌。

Mucin-like domain：黏蛋白样结构域　含有多个与丝氨酸或苏氨酸残基结合的 O- 连接聚糖的蛋白质区域。

Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MadCAM-1)：黏膜地址蛋白细胞黏附分子 -1 (MadCAM-1)　出现在黏膜表面的黏蛋白样穿膜蛋白质，当白细胞靶向进入黏膜和发炎组织时，MadCAM-1 可作为 L- 选凝素的配体。

Myelin-associated glycoprotein (MAG)：髓鞘相关糖蛋白 (MAG)　神经系统形成髓鞘的神经膜细胞和少突胶质细胞表面出现的唾液酸结合蛋白。

Myelin sheath：髓鞘　包被神经细胞轴突的富脂质层。在神经冲动有效传导过程中起电绝缘作用。

Neoglycoprotein：拟糖蛋白　用人工化学方法合成蛋白质与单糖或寡糖结合的模拟天然的糖缀合物。

Neolactoside：新乳糖苷　一种以核心结构 Galβ1-4Glc NAcβ1-3Galβ1-4Glc 为基础的鞘糖脂。

Neural cell adhesion molecule (NCAM)：神经细胞黏附分子 (NCAM)　神经细胞表达的免疫球蛋白超家族穿膜糖蛋白，参与了细胞间黏附和抗黏附两种相互作用。

Neuraminidase：神经氨酸酶　通常称之为唾液酸酶。严格地讲，神经氨酸酶是裂解未修饰的神经氨酸酶，但这一名称经常是指释放修饰形式的 NeuAc 和其他唾液酸。

Neurocan：神经蛋白聚糖　指出现在神经组织的硫酸软

骨素蛋白聚糖。

N-linked oligosaccharide/glycan：N- 连接寡糖 / 聚糖　通过氮原子连接的聚糖。即通过天冬酰胺残基酰胺氮键，与蛋白质结合的聚糖。

Nod factor：结瘤因子　由固氮菌产生的，与 β1-4 连接的 *N*- 乙酰葡糖胺 *N*- 酰基化的寡聚体。结瘤因子主导由固氮菌定植 (移地发育) 豆科植物根瘤的形成。

Node of Ranvier：朗飞结　在髓鞘中包绕轴突按一定间距出现暴露膜的间隙，并能发生电冲动。

Non-reducing end：非还原端　聚糖中单糖组分的 C1(神经氨酸的 C2) 羰基与糖苷键鳌合的聚糖部分。

Notch receptor：刻缺蛋白受体　也翻译为刻痕蛋白受体，参与发育组织图示形成的一种信号传送受体，与两种重要蛋白质配体，Delta 和 Serrate 相互作用。由结合表皮生长因子样结构域的 O- 连接聚糖修饰作用调控刻缺蛋白的配体的特异性。

Nuclear Overhauser effect：核奥弗豪泽效应　出现在核磁共振波谱中，因原子核间自旋极化转移而引起的现象。经过测量空间相互作用，确定未与共价键连接原子间的距离。

Nucleotide sugar donor：核苷酸糖供体　寡糖生物合成中，作为糖基转移酶活的糖分子。单糖连接核苷酸组成活化糖， UDP-GlcNAc 和 CMP- 唾液酸是这类糖供体代表性例子。

Oligodendrocyte：少突胶质细胞　存在于脊髓和脑中，包绕神经元轴突形成髓鞘的细胞。

Oligogalacturonide：寡聚半乳糖醛酸苷　从植物细胞壁释放连接半乳糖醛酸 α1-4 连接的寡聚体，是植物感染或受损的应答部分。

Oligosaccharins：寡糖素　植物中具有信号传送功能的寡糖。

Oligosaccharyltransferase：寡糖基转移酶　N- 连接糖基化途径中，从多萜醇到新生多肽链的转移前体寡糖的酶。寡糖基转移酶是与内质网膜缔合的多亚基复合物。

O-linked oligosaccharide/glycan：O- 连接寡糖 / 聚糖　通过氧原子连接的糖链，指通过丝氨酸或苏氨酸残基的羟基键与蛋白质相连的聚糖。

Oncofoetal antigen：肿瘤胚胎抗原　胚胎发育过程中正常表达的一类抗原蛋白质或聚糖，但在某些肿瘤表达水平上会产生变化。

OS-9：一种具有 P- 型糖识别域 (CRD) 的内质网蛋白质，在其输出进入胞质之前，与错折叠糖蛋白上高甘露糖型寡糖结合。

Pentose：戊糖　具有 5 碳原子的单糖。

Peptide *N*-glycanase (PNGase)：肽 -*N*- 连接聚糖酶 (PNGase) 用以裂解 *N*- 连接寡糖最深处 *N*- 乙酰葡糖胺和天冬酰胺残基之间的酶，可以用来从糖蛋白释放分析用的 N- 连接聚糖。

Perlican：串珠蛋白聚糖　细胞表面的一类硫酸乙酰肝素蛋白聚糖。

Permethylation：过甲基化反应　聚糖的全部游离羟基与甲基的反应。

Pili：纤毛　也称为菌毛，从细菌胞质膜伸出的蛋白质细管。各菌毛都有被称为菌毛蛋白构成的菌毛杆和在杆尖上与宿主细胞聚糖结合的黏附蛋白。

Proteoglycan：蛋白聚糖　存在于胞外基质和细胞表面的高度糖基化的特殊糖蛋白。它们由核心蛋白连接一个或多个糖胺聚糖链组成。

P-selectin：P- 选凝素　存在于内皮细胞和血小板中的选凝素细胞黏附分子，介导白细胞和血小板内皮发炎部位的黏附作用。

P-selectin glycoprotein ligand 1(PSGL-1)：P- 选凝素糖蛋白配体 1(PSGL-1)　P- 选凝素结合的主要糖蛋白配体， 是一种穿膜蛋白质，与延伸的黏蛋白样结构域出现在白细胞上。P- 选凝素与邻近 PSGL-1 N 端 O- 连接聚糖上的唾液酸化路易斯血型抗原 X 硫酸化酪氨酸残基结合。

P-type carbohydrate recognition domain (CRD)：P- 型糖识别域 (CRD)　在甘露糖 6- 磷酸受体中发现的一种

甘露糖 6- 磷酸结合域。

Ramachandran plot：拉式图　表示蛋白质氨基酸残基 φ 和 ψ 扭角的图式。

Receptor for low-density lipoprotein：低密度脂蛋白受体　一种介导含有胆固醇低密度脂蛋白颗粒摄入细胞的胞吞受体。

Reducing end：还原端　二糖、多糖或寡糖保有羰基功能的端部。

Rhizobial bacteria：根瘤菌　一组土壤固氮细菌。这组菌属与豆科植物根瘤共同生生长。

Ricin：蓖麻毒蛋白　存在于蓖麻油植物种子中毒性很高的植物蛋白。蓖麻毒蛋白与细胞表面半乳糖残基结合后，通过胞吞进入细胞。

R-type CRD：R- 型糖识别域　蓖麻毒蛋白样糖识别域。与蓖麻毒蛋白植物毒素半乳糖结合域一种同源的结合糖的结构域。

Schwann cell：神经膜细胞　或称作施万细胞。在外周神经系统中，包绕神经元轴突构成髓鞘的细胞。

Selectin cell adhesion molecules：选凝素细胞黏附分子　一组介导白细胞与内皮细胞黏附的膜结合 C- 型凝集素，包括 L- 型、P- 型和 E- 型三类选凝素。

Sialidase：唾液酸酶　即神经氨酸酶，从聚糖裂解，例如，NeuAc 和唾液酸的酶。

Sialoadhesin：唾液酸黏着蛋白　存在于巨噬细胞上结合唾液酸的蛋白质，是 I- 型凝集素涎免凝素 家族最大的成员，含有 17 个免疫球蛋白样结构域。

Sialyl-Lewis^{a}: 唾液酸化路易斯血型抗原 A　Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc 存在于 N- 连接和 O- 连接聚糖精细末端的四糖。

Sialyl-Lewis^{x}：唾液酸化路易斯血型抗原 X　Neu5Acα2-3 Galβ1-4 (Fucα1-3)GlcNAc 存在于 N- 连接和 O- 连接聚糖精细末端的四糖。

Sialylmotif：唾液酸模体　所有唾液酸转移酶特征化的保守短序列。

Sialyl-Tn epitope/antigen：Sialyl-Tn 表位 / 抗原　数种糖抗原中的一种，各种癌组织高水平表达的 NeuAcα2-6GalNAcα-THr/Ser O- 连接聚糖。

Sialyltransferase：唾液酸转移酶　糖蛋白或糖脂生物合成过程中，催化从活性 CMP- 唾液酸供体转移唾液酸到接纳体寡糖的酶。

Siglec: 涎免凝素　一组结构上相关结合唾液酸的、具有 I- 型糖识别域结合唾液酸的蛋白质，包括唾液酸黏着蛋白、CD22 和髓鞘相关糖蛋白 (MAG)。

Site analysis: 定位分析　测定蛋白质中特异氨基酸残基结合聚糖的方法。

Sulphatide：硫苷脂　脑酰胺与半乳糖 3- 硫酸连接的半乳糖神经鞘脂。

Surfactant proteins A and D(SP-A and SP-D)：表面活性型蛋白质 A 和 D(SP-A 和 SP-D)　肺中存在的 C- 型凝集素，胶原凝素亚组的两成员。

Swainsonine：苦马豆碱　高尔基体甘露糖苷酶 II 的一种可逆性植物碱抑制剂。

Syndecan：黏结蛋白聚糖　在多种细胞上存在的四穿膜硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族之一的蛋白聚糖。黏结蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素链与细胞表面生长因子相互作用。

System biology：系统生物学　采用数学模型分析、整合复杂的生物学数据，依据其组分性质，预测细胞或生物系统性状的研究方法。

Tay-Sachs disease：泰 - 萨病　一种因催化 GM2 神经节苷脂降解的α- 氨基己糖苷酶缺陷引起的糖脂贮积病。

Tetra-antennary：四天线　具有 4 条分支。是指 N- 连接复合寡糖有 4 条糖分支与三甘露糖核心连接。从核心的各分支再延伸两分支。

Tissue plasminogen actvivator：组织纤溶酶原激活物　由内衬血管细胞构成的丝氨酸蛋白酶。它可以激活具有溶解血凝块作用的纤溶酶原。

Tri-antennary：三天线　具有三个分支。是指 N- 连接复合寡糖有三条糖分支与三甘露糖核心连接。两分支从核心 1-6 支臂延伸，另一分支从 1-3 支臂延伸。

Trypanosome：锥虫　一种原生动物属单细胞锥虫，脊椎动物血液中的寄生虫。多数锥虫种对宿主无害，但有些锥虫引发严重的疾病，例如，克鲁斯锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) 引发锥虫病，布鲁斯锥虫 (*trypanosome brucei*) 引发昏睡病。

Tunicamycin：衣霉素　在 N- 连接糖基化前体寡糖合成的第一步骤抑制 UDP-GlcNAc 与多萜醇反应的一种细菌化合物。在实验研究中用以抑制 N- 连接糖基化。

Type Ⅱ transmembrane protein：Ⅱ型穿膜蛋白质　具有胞质 N 端，单一穿膜片段和 C 端胞外域的蛋白质。

Ubiquitin：泛素　与其他蛋白质共价连接，由 76 个氨基酸残基组成的蛋白质。泛素的 C- 末端与靶蛋白质的赖氨酸残基可以形成连键。蛋白质上添加泛素分子链，可以使蛋白质靶向蛋白酶体进行降解。

Variant surface glycoprotein：细胞表面多变糖蛋白　由糖基磷脂酰基醇锚，锚固在布鲁斯锥虫细胞膜的一种糖蛋白。细胞表面多变糖蛋白在锥虫细胞表面形成一层厚重的保护外衣。每一寄生物都有数百个这种不同的表面糖蛋白基因。

Versican：多功能蛋白聚糖　在多种组织中表达的硫酸软骨素蛋白聚糖，含有 12 ～ 16 条硫酸软骨素链。

VIP36 (Vesicular integral membrane protein of 36 kDa)：36 kDa 囊泡膜整合蛋白质　内质网 - 高尔基体中间区室 (ERGIC) 结合糖蛋白高甘露糖型寡糖的 L- 型凝集素。

VIPL：VIP 样蛋白质　L- 型凝集素家族的一个成员。

von Willebrand factor deficiency：冯 • 维勒布兰德因子病　因冯 • 维勒布兰德因子水平不足引起的血凝失常，亦称假血友病。

Xenoantigen：异种抗原　由一种物种表达，但不能被其它物种表达的抗原。

Xylosyltransferase：木糖基转移酶　糖蛋白合成中，从激活的 UDP- 木糖供体向寡糖接纳体或向蛋白聚糖蛋白核心转移木糖的酶。

索　引

